

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2001-13125

(P2001-13125A)

(43)公開日 平成13年1月19日 (2001.1.19)

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>

識別記号

F I

テーマコード(参考)

G 0 1 N 30/48

G 0 1 N 30/48

R

27/62

27/62

X

30/46

30/46

E

30/72

30/72

C

33/50

33/50

U

審査請求 有 請求項の数20 O L (全 22 頁)

(21)出願番号 特願2000-166659(P2000-166659)

(62)分割の表示 特願平10-186692の分割

(22)出願日 平成10年7月1日(1998.7.1)

(31)優先権主張番号 60/079,622

(32)優先日 平成10年3月27日(1998.3.27)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 09/069,890

(32)優先日 平成10年4月29日(1998.4.29)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 596121219

シンソーブ バイオテック, インコーポ  
レイテッド

Synsorb Biotech, Inc.

カナダ国 ティー2エヌ 3ビー5, ア  
ルバータ, カルガリー, ケンシントン  
ロード エヌ, ダブリュー, 1204,  
201

(74)代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 化合物ライブラリをスクリーニングする装置

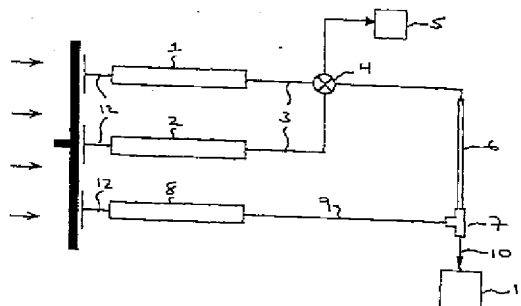
(57)【要約】 (修正有)

【課題】 質量分析計と組み合わせた前端クロマトグラフィーを用いて、化合物のライブラリをスクリーニングし、標的レセプターに結合するライブラリメンバーを同定し分類する装置の提供。

【解決手段】 複数の推定リガンドの、標的レセプターへの相対親和性または絶対親和性を決定する、以下の

(a)、(b)および(c)を有する装置：

(a) 流入末端および流出末端を有し、必要に応じて固相担体に結合した標的レセプターを含むカラム（該カラムは、前端クロマトグラフィー条件下で、複数の推定リガンドを含む化合物ライブラリを連続的に付与させ、で標的レセプターが化合物ライブラリと連続的に接触して、カラムの流出末端から溶出液を生じる）；(b) 化合物ライブラリをカラムに連続的に付与するために、カラムの流入末端に連結される第1レザバ；(c) カラムからの流出液を連続的または断続的に分析する質量分析計。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 化合物ライブラリをスクリーニングして、複数の推定リガンドの、標的レセプターへの相対親和性または絶対親和性を決定する装置であって、以下の(a)、(b)および(c)を有する、装置：

(a) 流入末端および流出末端を有しかつ標的レセプターを含有するカラム（ここで、該カラムは、前端クロマトグラフィー条件下にて、複数の推定リガンドを含む化合物ライブラリを連続的に付与させることができ、それにより、該標的レセプターが該化合物ライブラリと連続的に接触して、該カラムの該流出末端から溶出液を生じる）（ここで、該標的レセプターは、固相担体に結合していない）；

(b) 該化合物ライブラリを該カラムに連続的に付与するために、該カラムの該流入末端に連結される第1レザバ；および

(c) 該カラムからの該流出液を連続的または断続的に分析するために、該カラムの該流出末端に連結される質量分析計。

【請求項2】 さらに、以下の(d)を有する、請求項1に記載の装置：

(d) (i)前記化合物ライブラリおよび1種またはそれ以上のインジケータ化合物を含有する混合物、(ii)1種またはそれ以上のインジケータ化合物、あるいは(ii)緩衝溶液のいずれかを前記カラムに付与するために、該カラムの前記流入末端に連結される第2レザバ。

【請求項3】 さらに、以下の(e)を有する、請求項1に記載の装置：

(e) 前記質量分析計による分析前に、前記溶出液に補充希釈剤を供給するために、前記カラムの前記流出末端に連結される第3レザバ。

【請求項4】 複数の化合物ライブラリをスクリーニングして、各ライブラリ内の複数の推定リガンドの、標的レセプターへの相対親和性または絶対親和性を決定する装置であって、以下の(a)、(b)および(c)を有する、装置：

(a) 複数のカラムであって、各カラムが、流入末端および流出末端を有しかつ標的レセプターを含有する、複数のカラム（ここで、該カラムは各々、独立して、前端クロマトグラフィー条件下にて、複数の推定リガンドを含む化合物ライブラリを連続的に付与させることができ、それにより、該標的レセプターが該化合物ライブラリと連続的に接触して、該カラムの該流出末端から溶出液を生じる）（ここで、該標的レセプターは、固相担体に結合していない）；

(b) 複数の第1レザバであって、各第1レザバが、該カラムに化合物ライブラリを連続的に付与するために、該カラムのうちの1つの該流入末端に連結される、複数の第1レザバ；および

(c) 該各カラムからの該流出液を断続的に分析するた

に、該各カラムの該流出末端に連結される質量分析計。

【請求項5】 さらに、以下の(d)を有する、請求項4に記載の装置：

(d) 複数の第2レザバであって、各第2レザバが、(i)前記化合物ライブラリおよび1種またはそれ以上のインジケータ化合物を含有する混合物、(ii)1種またはそれ以上のインジケータ化合物、あるいは(ii)緩衝溶液のいずれかを前記各カラムに付与するために、該カラムのうちの1つの前記流入末端に連結される、第2レザバ。

【請求項6】 さらに、以下の(e)を有する、請求項4に記載の装置：

(e) 前記質量分析計による分析前に、前記各カラムからの溶出液に補充希釈剤を供給するために、該各カラムの前記流出末端に連結される第3レザバ。

【請求項7】 2個～約100個のカラムを有する、請求項4に記載の装置。

【請求項8】 3個～約50個のカラムを有する、請求項7に記載の装置。

【請求項9】 5個～約10個のカラムを有する、請求項8に記載の装置。

【請求項10】 各カラムが、次のカラムに切り換わる前の約0.5秒～約10秒の期間にわたって断続的にモニターされる、請求項4に記載の装置。

【請求項11】 各カラムが、次のカラムに切り換わる前の約1秒～約5秒間、断続的にモニターされる、請求項10に記載の装置。

【請求項12】 前記カラムが、約10 $\mu$ m～約4.6 mmの範囲の内径を有する、請求項1または4に記載の装置。

【請求項13】 前記カラムが、約100 $\mu$ m～約250 $\mu$ mの内径を有する、請求項12に記載の装置。

【請求項14】 前記カラムが、約1 cm～約30 cmの長さを有する、請求項1または4に記載の装置。

【請求項15】 前記カラムが、約2 cm～約20 cmの長さを有する、請求項1または4に記載の装置。

【請求項16】 前記標的レセプターが、タンパク質、糖タンパク質、グリコサミングリカン、プロテオグリカン、インテグリン、酵素、レクチン、セレクチン、細胞接着分子、毒素、細菌性線毛、輸送タンパク質、シグナル伝達またはホルモン結合に関与したレセプター、ホルモン、抗体、主要組織適合性複合体、免疫グロブリンスーパーファミリー、カドヘリン、DNAおよびDNAフラグメント、RNAおよびRNAフラグメント、全細胞、組織、細菌、真菌、ウイルス、寄生生物、プレオン、およびそれらの合成アナログまたは誘導体からなる群から選択される、請求項1または4に記載の装置。

【請求項17】 前記標的レセプターが、前記固相担体に共有結合されるか、またはバイオチン-アビジン結合またはバイオチン-ストレプトアビジン結合を介して結合される、請求項1または4に記載の装置。

10

20

30

40

50

【請求項18】 前記固相担体が、樹脂ビーズ、ガラスビーズ、シリカチップ、シリカキャピラリーおよびアガロースからなる群から選択される、請求項1または4に記載の装置。

【請求項19】 前記カラムが、約1 pmol〜約10 nmolの標的レセプター活性部位を含有する、請求項1または4に記載の装置。

【請求項20】 前記質量分析計が、エレクトロスプレー質量分析計である、請求項1または4に記載の装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本願は、代理人整理番号026579-172として1998年3月27日出願された米国暫定特許出願第\_\_\_\_/\_\_\_\_号(表題「Micro-Scale Frontal Affinity Chromatography Methods for the Screening of Compound Libraries」)の利益を主張し、この出願の内容は本明細書中で参考として援用される。

【0002】本発明は、化合物ライブラリ(例えば、コンビナトリアルケミストリー技術を用いて作成した化合物ライブラリ)をスクリーニングする装置に関する。本発明の装置は、質量分析計と組み合わせた前部クロマトグラフィーを用いて、化合物のライブラリをスクリーニングして、標的レセプターに結合するライブラリメンバーを同定しそして分類する。本発明の装置はまた、化合物ライブラリを迅速にスクリーニングして、このライブラリの任意のメンバーが、あらかじめ選択されたインジケーター化合物と比較して、この標的レセプターへの高い親和性を有するかどうかを決定する。

【0003】

【従来の技術】本願において、以下の刊行物、特許および特許出願が上付き番号として引用される：

<sup>1</sup> K. S. Lam, *Anti-Cancer Drug Des.* 1997, 12, 145-167;

<sup>2</sup> P. M. Sweetnam et al., In *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*; M. E. Wolff, Ed.; John Wiley & Sons: New York, 1995; pp 697-731;

<sup>3</sup> R. H. Griffey et al., In *Proceedings of the 45th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, Palm Springs, CA, June 1-5, 1997; p. 400;

<sup>4</sup> L. Fang et al., In *Proceedings of the 45th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, Palm Springs, CA, June 1-5, 1997; p. 401;

<sup>5</sup> Y. -H. Chu et al., *J. Am. Chem. Soc.* 1996, 118, 7827-7835;

<sup>6</sup> Y. -Z. Zhao et al., *J. Med. Chem.* 1997, 40, 4006-4012;

<sup>7</sup> Y. F. Hsieh et al., *J. Mol. Div.* 1996 2, 189-196;

<sup>8</sup> R. W. Nelson et al., *Anal. Chem.* 1995, 67, 1153-1158;

<sup>9</sup> D. C. Schriemer and L. Li, *Anal. Chem.* 1996, 68, 3382-3387;

<sup>10</sup> PCT/US97/07964 (International Publication No. WO 97/43641), published November 20, 1997, entitled "Molecular Diversity Screening Device and Method";

<sup>11</sup> R. Wieboldt et al., *Anal. Chem.* 1997, 69, 1683-1691;

<sup>12</sup> R. B. van Breemen et al., *Anal. Chem.* 1997, 69, 2159-2164;

<sup>13</sup> M. L. Nedved et al., *Anal. Chem.* 1996, 68, 4228-4236;

<sup>14</sup> PCT/US95/03355 (International Publication No. WO 95/25737), published September 28, 1995, entitled "Method for Identifying Members of Combinatorial Libraries";

<sup>15</sup> PCT/EP97/02215 (International Publication No. WO 97/43301), published November 20, 1997, entitled "Identification of Members of Combinatorial Libraries By Mass Spectrometry".

【0004】上記刊行物、特許および特許出願の内容は、個々の各刊行物、特許または特許出願の内容を本明細書中で参考として援用するために具体的かつ個別的に示すような同じ程度まで、本明細書中で参考として援用される。

【0005】近年、非常に多くのコンビナトリアルケミストリー技術が開発され、これらの技術により、多様な化合物(chemical compound)の膨大なライブラリを迅速に合成することが可能となった<sup>1</sup>。コンビナトリアルケミストリーでは、一連の化学反応は、典型的には、各工程において、複数の試薬を使用して行われ、化合物の1ライブラリが作成される。このような手法は、生物学的スクリーニング用の多様な化合物の多数の集合体(collection)を提供することにより、生物学的に有用な特性を有する新規化合物の発見を著しく促進する可能性がある。

【0006】コンビナトリアルケミストリー技術を用いて化合物の多数の集合体を迅速に作成するこの能力は、化合物ライブラリをスクリーニングする新規方法の必要性を生み出した。各化合物をアッセイにて個々にスクリーニングし、所望の生物学的活性を有する化合物を同定するための伝統的なアプローチは、時間および財源上の制約のために、もはや実用的ではない。それゆえ、化合物ライブラリを迅速にスクリーニングし得る、新規な方法および装置が必要である。

【0007】このことに関して、化合物ライブラリをスクリーニングする種々の方法が報告されている。典型的には、これらのスクリーニング方法は、蛍光基または他のレポーター基で標識されている標的レセプターの使用に関する<sup>2</sup>。これらの方法では、この化合物ライブラリ

(典型的には、樹脂ビーズに結合している)が標識された標的レセプターに曝され、そして標識された標的レセプターに結合するメンバーが同定され、そして物理的に分離される。次いで、この標的レセプターに結合する特定のリガンドが同定される。これらの方法の多くでは、ライブラリの個々のメンバーを追跡するために、精巧な手順が必要である。例えば、コンビナトリアルライブラリの合成中には、個々のメンバーの構造を引き続いて決定するために、コード化されたタグがしばしば付加される。あるいは、コンビナトリアルライブラリは、ある配列で作成され得、続いて、このライブラリの個々のメンバーはこの配列内の位置によって同定され得る。このような方法は効果的であり得るものの、その合成およびスクリーニング中に、ライブラリの個々のメンバーを追跡する必要があることは、極めて面倒であり、使用できる合成手順のタイプがしばしば限られる。さらに、これらの方法の多くでは、その合成手順が固相上で行なわれる必要があり、それにより、使用できる合成手順および試薬がさらに限られる。

【0008】代案として、コンビナトリアルライブラリの疑問に対する重要な手段として、質量分析が出現した。質量分析は、これまで、ライブラリの質を評価するために使用されており<sup>3,4</sup>、分子認識技術と組み合わせるとき、活性ライブラリ化合物の単離および特性付けにおいて、ある程度の成功を収めている<sup>5-15</sup>。典型的には、化合物ライブラリを生物学的に活性なメンバーについてスクリーニングする場合、質量分析は、「捕捉および解放(capture and release)」方法論と組み合わせて使用される。この方法論では、化合物の混合物が、その標的レセプター(これは、しばしば、固体担体上に固定化されている)に提供され、得られたリガンド-レセプター複合体は、このライブラリのうちの非結合メンバーから分離される。分離後、典型的には、このリガンド-レセプター複合体は、例えば、溶媒を用いて変性され、そして先に結合したリガンドを含む溶媒混合物が質量分析計に提供されて、高親和性リガンドの同定を可能とする。

【0009】例えば、コンビナトリアルライブラリをスクリーニングするために、限外濾過がエレクトロスプレー質量分析と組み合わせて使用されている<sup>10-12</sup>。この方法において、化合物ライブラリ中に存在するリガンドはレセプターに結合され、得られたリガンド-レセプター複合体は、限外濾過により精製される。次いで、このリガンド-レセプター複合体は、溶媒(例えば、メタノール)を用いて解離され、そして先に結合したリガンドがエレクトロスプレー質量分析計により検出される。

【0010】アフィニティークャピラリー電気泳動(ACE)もまた、コンビナトリアルライブラリをスクリーニングするために、質量分析とカップリングされる<sup>5</sup>。この手順において、ACEは、非結合リガンドからリガンド-

レセプター複合体を分離するのに使用され、そして質量分析は高親和性リガンドを同定するのに使用される。

【0011】同様に、化合物ライブラリは、質量分析と組み合わせたアフィニティークロマトグラフィーを用いてスクリーニングされている。例えば、WO 97/43301は、コンビナトリアルライブラリのメンバーを特徴付ける方法を記載しており、この方法は、親和性の選択を質量分析と組み合わせて使用する。具体的には、このライブラリのメンバーは、結合(すなわち、複合体の形成)を可能にするドメインと接触される。結合後、典型的には、この複合体は、この複合体を含むカラムから非結合メンバーを洗い出すことにより、ライブラリの非結合メンバーから分離される。次いで、この複合体は、結合したライブラリ成分を溶出するために処理され、そして溶出された成分は質量分析により分析される。記載された溶出方法は、ディスプレーサー、カオトロピック試薬(chao trope agent)、pH溶出、塩勾配、温度勾配、有機溶媒、選択的変性および洗浄剤の使用を包含する。このような方法を用いると、その称するところによれば、このライブラリの弱く結合したメンバーがまず溶出され、そして質量分析により分析され、続いて、より強く結合したメンバーが溶出される。

【0012】

【発明が解決しようとする課題】先に報告した化合物ライブラリをスクリーニングする「捕捉および解放」方法に付随して、いくつかの欠点が存在する。まず、リガンド-レセプター複合体から結合リガンドを「解放する」のに使用される手順は、種々の結合リガンドの結合プロファイルを変える場合があり、その結果、結合力の示唆に誤りが生じる。例えば、ライブラリの結合メンバーを解放するのにpH勾配を用いると、そのレセプター上の結合部位の電気的特性を変えて、生理的条件下で強く結合したリガンドが早まって解放される場合がある。それゆえ、それらの相対的な解放時間に基づいた種々のリガンドについての結合力の特徴付けは、その解放条件が結合条件とは異なるのであれば、誤った方向に導かれる場合がある。従って、これらの方法は、化合物ライブラリの最も活性の高いメンバーを正確に同定しない場合がある。さらに、化合物の解放に使用されるある条件(例えば、pH勾配)は、レセプターを不可逆的に変性し、それにより、そのレセプター引き続いて化合物ライブラリのスクリーニングに使用するのが妨げられる場合がある。

【0013】さらに、「捕捉および解放」方法を使用するとき、各結合リガンドは、典型的には、比較的短時間で解放され、その結果、例えば、各リガンドに対する溶出ピークまたは「スパイク」が得られる。従って、このような方法を用いて生じる溶出液は、典型的には、いずれの特定の溶出ピークも見逃さないように、例えば、質量分析によって、継続的にモニターされる。それゆえ、ある特定の質量分析を用いて行い得る分析の数が限

10

20

30

40

50

られてくる。従って、「捕捉および解放」方法論に依存しない化合物ライブラリのスクリーニング方法および装置を開発することが望まれている。

【0014】

【課題を解決するための手段】本発明の1つの局面では、化合物ライブラリをスクリーニングして、複数の推定リガンドの、標的レセプターへの相対親和性または絶対親和性を決定する装置であって、以下の(a)、(b)および(c)を有する装置が提供される：(a) 流入末端および流出末端を有しかつ必要に応じて固相担体に結合した標的レセプターを含有するカラム（ここで、該カラムは、前端クロマトグラフィー条件下にて、複数の推定リガンドを含む化合物ライブラリを連続的に付与させることができ、それにより、該標的レセプターが該化合物ライブラリと連続的に接触して、該カラムの該流出末端から溶出液を生じる）；(b) 該化合物ライブラリを該カラムに連続的に付与するために、該カラムの該流入末端に連結される第1レザバ；および(c) 該カラムからの該流出液を連続的または断続的に分析するために、該カラムの該流出末端に連結される質量分析計。

【0015】好適な実施態様によれば、上記装置は以下の(d)をさらに有する：(d) (i)前記化合物ライブラリおよび1種またはそれ以上のインジケータ化合物を含有する混合物、(ii)1種またはそれ以上のインジケータ化合物、あるいは(iii)緩衝溶液のいずれかを前記カラムに付与するために、該カラムの前記流入末端に連結される第2レザバ。

【0016】好適な実施態様によれば、上記装置は以下の(e)をさらに有する：(e) 前記質量分析計による分析前に、前記溶出液に補充希釈剤を供給するために、前記カラムの前記流出末端に連結される第3レザバ。

【0017】本発明の別の局面では、複数の化合物ライブラリをスクリーニングして、各ライブラリ内の複数の推定リガンドの、標的レセプターへの相対親和性または絶対親和性を決定する装置であって、以下の(a)、(b)および(c)を有する装置が提供される：(a) 複数のカラムであって、各カラムが、流入末端および流出末端を有しかつ必要に応じて固相担体に結合した標的レセプターを含有する、複数のカラム（ここで、該カラムは各々、独立して、前端クロマトグラフィー条件下にて、複数の推定リガンドを含む化合物ライブラリを連続的に付与させることができ、それにより、該標的レセプターが該化合物ライブラリと連続的に接触して、該カラムの該流出末端から溶出液を生じる）；(b) 複数の第1レザバであって、各第1レザバが、該カラムに化合物ライブラリを連続的に付与するために、該カラムのうちの1つの該流入末端に連結される、複数の第1レザバ；および

(c) 該各カラムからの該流出液を断続的に分析するために、該各カラムの該流出末端に連結される質量分析計。

【0018】好適な実施態様では、上記装置は以下の(d)をさらに有する：(d) 複数の第2レザバであって、各第2レザバが、(i)前記化合物ライブラリおよび1種またはそれ以上のインジケータ化合物を含有する混合物、(ii)1種またはそれ以上のインジケータ化合物、あるいは(iii)緩衝溶液のいずれかを前記各カラムに付与するために、該カラムのうちの1つの前記流入末端に連結される、第2レザバ。

【0019】好適な実施態様では、上記装置は以下の(e)をさらに有する：(e) 前記質量分析計による分析前に、前記各カラムからの溶出液に補充希釈剤を供給するために、該各カラムの前記流出末端に連結される第3レザバ。

【0020】好適な実施態様では、上記装置は2個〜約100個のカラムを有する。

【0021】さらに好適な実施態様では、上記装置は3個〜約50個のカラムを有する、請求項7に記載の装置。

【0022】さらに好適な実施態様では、上記装置は5個〜約10個のカラムを有する。

【0023】好適な実施態様では、各カラムは、次のカラムに切り換わる前の約0.5秒〜約10秒の期間にわたって断続的にモニターされる。

【0024】さらに好適な実施態様では、各カラムは、次のカラムに切り換わる前の約1秒〜約5秒間、断続的にモニターされる。

【0025】好適な実施態様では、上記カラムは約10 $\mu$ m〜約4.6 mmの範囲の内径を有する。

【0026】さらに好適な実施態様では、上記カラムは約100 $\mu$ m〜約250 $\mu$ mの内径を有する。

【0027】好適な実施態様では、上記カラムは約1 cm〜約30 cmの長さを有する。

【0028】さらに好適な実施態様では、上記カラムは約2 cm〜約20 cmの長さを有する。

【0029】好適な実施態様では、上記標的レセプターは、タンパク質、糖タンパク質、グリコサミノグリカン、プロテオグリカン、インテグリン、酵素、レクチン、セレクチン、細胞接着分子、毒素、細菌性線毛、輸送タンパク質、シグナル伝達またはホルモン結合に関与したレセプター、ホルモン、抗体、主要組織適合性複合体(major histocompatibility complex)、免疫グロブリンスーパーファミリー、カドヘリン、DNAおよびDNAフラグメント、RNAおよびRNAフラグメント、全細胞(whole cell)、組織、細菌、真菌、ウイルス、寄生物、プレオン(preon)、およびそれらの合成アナログまたは誘導体からなる群から選択される。

【0030】好適な実施態様では、上記標的レセプターは固相担体に結合される。

【0031】さらに好適な実施態様では、上記標的レセプターは、前記固相担体に共有結合されるか、またはビオチン-アビジン結合またはビオチン-ストレプトアビ

ジン結合を介して結合される。

【0032】さらに好適な実施態様では、上記固相担体は、樹脂ビーズ、ガラスビーズ、シリカチップ、シリカキャピラリーおよびアガロースからなる群から選択される。

【0033】好適な実施態様では、上記カラムは、約1 pmol〜約10 nmolの標的レセプター活性部位を含有する。

【0034】好適な実施態様では、上記質量分析計はエレクトロスプレー質量分析計である。

【0035】本発明は、化合物ライブラリをスクリーニングする装置に関する。この化合物ライブラリは、例えば、コンビナトリアルケミストリー技術を含めた任意の手段によるか、または発酵プロセス、植物抽出物、細胞抽出物などから作成され得るかまたは得られる。本発明の装置は、質量分析(MS)と組み合わせた前端クロマトグラフィー(FC)を使用して、化合物のライブラリをスクリーニングし、標的レセプターに結合するライブラリメンバーを同定しそして分類する。

【0036】前端クロマトグラフィーにおいて、標的レセプターは、典型的には、適当な固体担体材料に固定化されて、カラムに充填される。次いで、推定リガンド(putative ligand)を含有する混合物がカラムに連続的に注入される。標的レセプターへの親和性を有するリガンドがこのカラムに結合するが、やがて各リガンドに対するカラムの容量が限界を越えると、これらのリガンドはその注入濃度にて溶出するかまたは「破過する(break-through)」。リガンドがカラムから一度溶出し始めると、リガンドは連続的に溶出液中に存在する。標的レセプターに対して殆どまたは全く親和性がない化合物は、そのレセプターへのより高い親和性を有するリガンドと比較してより早く溶出液中に破過する。

【0037】本発明では、FC溶出液を連続的または断続的にモニターするために、質量分析(MS)を使用する。MSを用いると、カラム上の各リガンドの同定および破過時間が決定され得る。それゆえ、FC-MSは、ライブラリーの各メンバーの、標的レセプターへの相対親和性を、リガンド-レセプター結合条件下で、そのライブラリー他のメンバーと比較して決定することを可能とする。本発明の装置を用いると、化合物ライブラリーの各メンバーの、標的レセプターへの相対親和性の正確な分類を確定し得る。

【0038】従って、本発明は、装置局面の1つにおいて、化合物ライブラリをスクリーニングして、複数の推定リガンドの標的レセプターへの相対親和性または絶対親和性を決定する装置に関し、該装置は、以下の(a)、(b)および(c)を有する：

(a) 流入末端および流出末端を有しかつ必要に応じて固相担体に結合した標的レセプターを含有するカラム（ここで、該カラムは、前端クロマトグラフィー条件下に

て、複数の推定リガンドを含む化合物ライブラリを連続的に付与させることができ、それにより、該標的レセプターが該化合物ライブラリと連続的に接触して、該カラムの該流出末端から溶出液を生じる）；

(b) 該化合物ライブラリを該カラムに連続的に付与するために、該カラムの該流入末端に連結される第1レザバ；および

(c) 該カラムからの該流出液を連続的または断続的に分析するために、該カラムの該流出末端に連結される質量分析計。

10

【0039】好ましい実施態様では、上記装置は、以下の(d)をさらに有する：

(d) (i)前記化合物ライブラリおよび1種またはそれ以上のインジケータ化合物を含有する混合物、(ii)1種またはそれ以上のインジケータ化合物、あるいは(ii)緩衝溶液のいずれかを前記カラムに付与するために、該カラムの前記流入末端に連結される第2レザバ。

【0040】他の好ましい実施態様では、上記装置は、さらに、以下の(e)を有する：

20

(e) 前記質量分析計による分析前に、前記溶出液に補充希釈剤を供給するために、前記カラムの前記流出末端に連結される第3レザバ。

【0041】好ましくは、本発明で使用するカラムは、約10μm〜約4.6 mmの範囲の内径(i.d.)を有する。さらに好ましくは、このカラムの内径は、約100μm〜約250 μmの範囲である。

【0042】好ましくは、このカラムは、その長さが約1 cm〜約30cm、さらに好ましくは、約2 cm〜約20 cmの範囲である。

30

【0043】好ましくは、前記標的レセプターは、タンパク質、糖タンパク質、グリコサミングリカン、プロテオグリカン、インテグリン、酵素、レクチン、セレクチン、細胞接着分子、毒素、細菌性線毛、輸送タンパク質、シグナル伝達またはホルモン結合に関与したレセプター、ホルモン、抗体、主要組織適合性複合体、免疫グロブリンスーパーファミリー、カドヘリン、DNAおよびDNAフラグメント、RNAおよびRNAフラグメント、全細胞、組織、細菌、真菌、ウイルス、寄生生物、プレオン、およびそれらの合成アナログまたは誘導体からなる群から選択される。

40

【0044】さらに、前記標的レセプターは、好ましくは、固相担体に結合される。さらに好ましくは、前記標的レセプターは、前記固相担体に共有結合されるか、またはビオチン-アビジン結合またはビオチン-ストレプトアビジン結合を介して結合される。

【0045】好ましくは、本発明で使用する固相担体は、樹脂ビーズ、ガラスビーズ、シリカチップ、シリカキャピラリーおよびアガロースからなる群から選択される。

50

【0046】本発明で使用するカラムは、好ましく

は、約1 pmol〜約10 nmolの標的レセプター活性部位を含有する。

【0047】好ましくは、本発明で使用する質量分析計は、エレクトロスプレー質量分析計である。

【0048】さらに、カラムを一度破過すれば、リガンドはFC条件下において連続的に溶出するので、FC-MSは、溶出液をコンスタントにモニターする必要がない。従って、各カラムを断続的にモニターするための単一の質量分析計を用いて、複数のFC-MS分析が同時に行なわれ得る。

【0049】従って、本発明は、別の装置局面において、複数の化合物ライブラリをスクリーニングして、各ライブラリ内の複数の推定リガンドの、標的レセプターへの相対親和性または絶対親和性を決定する装置を提供し、該装置は、以下の(a)、(b)および(c)を有する：

(a) 複数のカラムであって、各カラムが、流入末端および流出末端を有しかつ必要に応じて固相担体に結合した標的レセプターを含有する、複数のカラム（ここで、該カラムは各々、独立して、前端クロマトグラフィー条件下にて、複数の推定リガンドを含む化合物ライブラリを連続的に付与させることができ、それにより、該標的レセプターが該化合物ライブラリと連続的に接触して、該カラムの該流出末端から溶出液を生じる）；

(b) 複数の第1レザバであって、各第1レザバが、該カラムに化合物ライブラリを連続的に付与するために、該カラムのうちの1つの該流入末端に連結される、複数の第1レザバ；および

(c) 該各カラムからの該流出液を断続的に分析するために、該各カラムの該流出末端に連結される質量分析計。

【0050】好ましい実施態様では、上記装置は、さらに、以下の(d)を有する：

(d) 複数の第2レザバであって、各第2レザバが、(i) 前記化合物ライブラリおよび1種またはそれ以上のインジケーター化合物を含有する混合物、(ii) 1種またはそれ以上のインジケーター化合物、あるいは(iii) 緩衝溶液のいずれかを前記各カラムに付与するために、該カラムのうちの1つの前記流入末端に連結される、第2レザバ。

【0051】他の好ましい実施態様では、上記装置は、さらに、以下の(e)を有する：

(e) 前記質量分析計による分析前に、前記各カラムからの溶出液に補充希釈剤を供給するために、該各カラムの前記流出末端に連結される第3レザバ。

【0052】好ましくは、上記装置は、2個〜約100個のカラム、より好ましくは、3個〜約50個のカラム、さらにより好ましくは、5個〜約10個のカラムを有する。

【0053】好ましくは、各カラムが、次のカラムに切り換わる前の約0.5秒〜約10秒の期間にわたって、好ましくは、約1秒〜約5秒間、断続的にモニターされる。

【0054】

【発明の実施の形態】本発明は、質量分析と組み合わせて前端クロマトグラフィーを用いて、化合物ライブラリをスクリーニングする装置を提供する。本発明の装置を記述するとき、以下の用語は、他に指示がなければ、以下の意味を有する。ここで定義していない全ての用語は、当該技術分野で認められている通常の意味を有する。

#### 【0055】定義

「破過時間(break through time)」との用語は、空隙容量の溶出と、前端クロマトグラフィー中での特定の化合物の溶出に対応する前端との間にかかる時間を意味する。

【0056】「化合物ライブラリ」との用語は、いずれかの方法により作成したまたは得た1個またはそれ以上の推定リガンドの混合物または集合体を意味する。好ましくは、このライブラリは、1個より多い推定リガンドまたはメンバーを含有する。

【0057】「エレクトロスプレー」との用語は、流動溶液からの気相イオンの発生を意味する。エレクトロスプレーは、典型的には、補助的な噴霧化または溶媒エバポレーションを伴ってまたはそれなしで、電場にて、大気圧で行われる。

【0058】「流出液」との用語は、前端クロマトグラフィーカラムから出現するかまたは出てくる溶媒または溶液を意味する。

【0059】「前端クロマトグラフィー条件」との用語は、クロマトグラフィー中において、その標的レセプターが推定リガンドに連続的に接触するように、推定リガンドの溶液を、この標的レセプターを含むカラムに、一定濃度で、連続的に付与するかまたは注入したクロマトグラフィー条件を意味する。

【0060】「インジケーター化合物」との用語は、その標的レセプターに対する既知の親和性または特異性および前端クロマトグラフィー条件下にて測定可能な破過時間を有する化合物を意味する。

【0061】「リガンド」との用語は、レセプターの1個またはそれ以上の特定の部位に結合する分子または分子群を意味する。代表的なリガンドには、例えば、炭水化物、モノサッカライド、オリゴサッカライド、ポリサッカライド、アミノ酸、ペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチド、タンパク質、ヌクレオシド、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド(DNAおよびDNAフラグメント、RNAおよびRNAフラグメントを含めて)など；脂質、レチノイド、ステロイド、グリコペプチド、グリコタンパク質、プロテオグリカンなど；およびそれらの合成アナログまたは誘導体(ペプチド擬態物、小分子有機化合物などを含めて)、およびそれらの混合物が挙げられる。「推定リガンド」との用語は、標的レセプターに対するその親和性または特異性(もしあれば)が決定されていないリガンドを意味する。

【0062】「マイクロカラム」との用語は、約1mm以下の内径を有するカラムを意味する。

【0063】「選択イオンクロマトグラム」との用語は、単一イオンの強度から構成されるイオン豊富度假時間-時間のプロットを意味する。選択イオンクロマトグラムは、走査または選択イオンモニターモードから作成できる。

【0064】「選択イオンモニター」との用語は、質量分析計(例えば、四極子)を用いて、あらかじめ選択した少数のイオンを検出することを意味する。

【0065】「固体担体」または「固相担体」との用語は、直接または結合アームを介して、標的レセプターが結合またはカップリングできる不活性材料または分子を意味する。

【0066】「合成小分子有機化合物」との用語は、一般に、約1000未満、好ましくは、約500未満の分子量を有する有機化合物を意味し、これらは、有機合成技術(例えば、コンビナトリアルケミストリー技術)により調製される。

【0067】「補充希釈剤」または「補充流れ」とは、流出液がエレクトロスプレー質量分析計に入る前に、カラムからの流出液と組み合わせた溶液または溶媒を意味する。

【0068】「標的レセプター」または「レセプター」との用語は、特異的な部位にて、リガンドに結合できる分子または分子群を意味する。標的レセプターの代表的な例には、例えば、タンパク質、糖タンパク質、グリコサミノグリカン、プロテオグリカン、インテグリン、酵素、レクチン、セレクチン、細胞接着分子、毒素、細菌性線毛、輸送タンパク質、シグナル伝達またはホルモン結合に関与したレセプター、ホルモン、抗体、主要組織適合性複合体(MHC)、免疫グロブリンスーパーファミリー、カドヘリン、DNAまたはDNAフラグメント、RNAおよびRNAフラグメント、全細胞、組織、細菌、真菌、ウイルス、寄生生物、プレオン、および上記のいずれかの合成アナログまたは誘導体が包含される。

【0069】「標的レセプター活性部位」との用語は、特定の標的レセプター上の目的の結合部位を意味する。

【0070】「全イオンクロマトグラム」との用語は、走査における全てのイオン強度の合計から構成されるイオン豊富度假時間-時間のプロットを意味する。全イオンクロマトグラムでは、走査数は、時間と線形的に関連している。

【0071】「空隙容量」または「V<sub>0</sub>」との用語は、注入時点から検出時点まで、前端クロマトグラフィーカラムを破過する溶液の容積を意味する。その標的レセプターに親和性がない推定リガンドは、典型的には、この空隙容量で、カラムから溶出する。

【0072】本発明で使用する化合物ライブラリは、例えば、コンビナトリアルケミストリー技術、発酵方法、

植物および細胞抽出手順など(これらに限定されない)を含めたいずれかの手段により、作成できるかまたは得ることができる。コンビナトリアルライブラリを作成する方法は、当該技術分野で周知である。例えば、E. R. Felder, *Chimia* 1994, 48, 512-541; Gallopら, *J. Med. Chem.* 1994, 37, 1233-1251; R. A. Houghten, *Trends Genet.* 1993, 9, 235-239; Houghtenら, *Nature* 1991, 354, 84-86; Lamら, *Nature* 1991, 354, 82-84; Carellら, *Chem. Biol.* 1995, 3, 171-183; Maddenら, *Perspectives in Drug Discovery and Design* 2, 269-282; Gwirlaら, *Biochemistry* 1990, 87, 6378-6382; Brennerら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992, 89, 5381-5383; Gordonら, *J. Med. Chem.* 1994, 37, 1385-1401; Leblら, *Biopolymers* 1995, 37, 177-198; およびそれらで引用された参考文献を参照せよ。これらの参考文献の各内容は、その全体を、本明細書中で参考として援用されている。

【0073】標的レセプターに結合できるいずれのタイプの分子も、この化合物ライブラリに存在できる。例えば、本発明を用いてスクリーニングした化合物ライブラリは、天然に生じる分子(例えば、炭水化物、モノサッカライド、オリゴサッカライド、ポリサッカライド、アミノ酸、ペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチド、タンパク質、ヌクレオシド、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド(DNAまたはDNAフラグメント、RNAおよびRNAフラグメントを含めて)など; 脂質、レチノイド、ステロイド、グリコペプチド、糖タンパク質、プロテオグリカンなど; あるいは天然に生じる分子の合成アナログまたは誘導体(例えば、ペプチド擬態物など); および天然に生じない分子(例えば、コンビナトリアルケミストリー技術を用いて作成した「小分子」有機化合物); ならびにそれらの混合物を含有できる。

「小分子有機化合物」との用語は、一般に、約1000未満の分子量、好ましくは、約500未満の分子量を有する有機化合物を意味する。

【0074】FC-MSの特定の利点は、例えば、1個の異性体(例えば、鏡像異性体またはジアステレオマー)が標的レセプターに結合しているかどうか、あるいは異性体が標的レセプターに対して異なる親和性を有するかどうかを決定するために、ラセミ混合物を含む化合物ライブラリがスクリーニングできることにある。このことに関して、これらの異性体が標的レセプターに対して異なる親和性を有するなら、各異性体について、異なる破過時間が認められる。

【0075】本発明で使用する化合物ライブラリは、典型的には、複数のメンバーまたは推定リガンドを含有する。インジケーター化合物を使用するとき、この化合物ライブラリは、好ましくは、約50,000個未満のメンバーを含有し、さらに好ましくは、この化合物ライブラリは、約10,000個未満のメンバーを含有する。インジケ-

10

20

30

40

50



ター化合物を使用しないとき、この化合物ライブラリは、好ましくは、約10,000個未満のメンバー、さらに好ましくは、1個〜約1,000個のメンバー、そしてさらに好ましくは、約5個〜約100個のメンバーを含有する。

【0076】本発明の装置は、リガンドと結合するかまたは複合体化するいずれかの標的レセプターまたはドメインに対する、化合物ライブラリのメンバーの親和性を分析するのに有用である。例えば、この標的レセプターは、タンパク質、糖タンパク質、グリコサミノグリカン、プロテオグリカン、インテグリン、酵素、レクチン、セレクチン、細胞接着分子、毒素、細菌性線毛、輸送タンパク質、シグナル伝達またはホルモン結合に関与したレセプター、ホルモン、抗体、主要組織適合性複合体(MHC)、免疫グロブリンスーパーファミリー、カドヘリン、DNAもしくはDNAフラグメント、RNAおよびRNAフラグメント、全細胞、組織、細菌、真菌、ウイルス、寄生生物、プレオンなど、あるいは上記のもののいずれかの合成アナログまたは誘導体からなる群から選択され得るが、これらに限定されない。

【0077】本発明の装置を使用するとき、その標的レセプターは、必要に応じて、固体担体に結合またはカップリングされる。好ましくは、この標的レセプターは、この固体担体に共有結合的に結合またはカップリングされる。しかしながら、ある場合、例えば、この標的レセプターとして全細胞または微生物を使用する場合、この細胞または微生物は、例えば、そのカラムの流出末端において多孔性フリットを用いることにより、このカラム内に含有させてもよい。レセプターに対する担体は、当該技術分野で周知であり、多くは市販されている。本発明では、任意のこのような通常の担体が使用できる。代表的な担体には、例えば、樹脂ビーズ、ガラスビーズ、シリカチップおよびキャピラリー、アガロースなどが挙げられる。この固体担体としてシリカキャピラリーを使用するとき、この標的レセプターは、このカラムの壁に直接結合される。本発明で使用するのに好ましい固体担体には、多孔性樹脂ビーズが挙げられる。特に好ましい固体担体は、多孔性ポリスチレン-ジビニルベンゼンポリマービーズ(例えば、POROSビーズ(これは、Perseptiv e Biosystems, Farmingham, MAから入手できる))である。

【0078】この標的レセプターは、当該技術分野で認められている任意の手順を用いて、この担体に結合またはカップリングできる。例えば、この標的レセプターは、直接固定化法(すなわち、スルフヒドリル基、アミノ基またはカルボキシル基などを介した共有結合)、結合アームまたはスパーサーアームによる共有結合、ビオチン-アビジン結合、ビオチン-ストレプトアビジン結合、抗体結合、GST-グルタチオン結合、イオン交換吸収、疎水性相互作用、マルトース結合タンパク質に融合

した組み換えタンパク質としての標的レセプターの発現、アフィニティーカラムに選択的に結合するペプチドとの標的レセプターの融合などを用いて、結合できる。このような方法は、当該技術分野で周知であり、そしてこれらの方法の多くの実施するキットは、市販されている。例えば、Stammersら、FEBS Lett. 1991, 283, 298-302; Hermanら、Anal. Biochemistry 1986, 156, 48; Smithら、FEBS Lett. 1987, 215, 305; Kilmartinら、J. Cell. Biol. 1982, 93, 576-582; Skinnerら、J. Biol. Chem. 1991, 266, 14163-14166; Hoppら、Bio/Technology 1988, 6, 1204-1210; H. M. Sassenfeld, TIBTECH 1990, 8, 88-93; Hankeら、J. General Virology 1992, 73, 654-660; Ellisonら、J. Biol. Chem. 1991, 267, 21150-21157; U. K. Pati, Gene 1992, 114, 285-288; Wadzinskiら、J. Biol. Chem. 1992, 267, 16883-16888; Fieldら、Mol. Cell. Biol. 1988, 8, 2159-2165; Gerardら、Biochemistry 1990, 29, 9274-9281; Ausellbergら、Fibrinolysis 1993, 7, 1-13; Hoppら、Biotechnology 1988, 6, 1205-1210; Blonarら、Science 1992, 256, 1014-1018; Linら、J. Org. Chem. 1991, 56, 6850-6856; Zastrowら、J. Biol. Chem. 1992, 267, 3530-3538; Goldsteinら、EMBO Jml. 1992, 11, 0000-0000; Limら、J. Infectious Disease 1990, 162, 1263-1269; Goldsteinら、Virology 1992, 190, 889-893; および IBI FLAG Epitope Vol.1: No. 1, Sept. 1992に記載の論文; およびそれらで引用された参考文献を参照せよ。これらの各参考文献の内容は、その全体について、本明細書中で参考として援用されている。

【0079】本発明の好ましい実施態様では、この標的レセプターは、ビオチン-アビジン結合、ビオチン-ストレプトアビジン結合または関連したタイプの結合を用いて、この固体担体に結合される。この手順では、この標的レセプターは、典型的には、スパーサーアームを含むビオチン試薬でビオチン化される。ビオチン化した標的レセプターは、次いで、アビジン含有固体担体と接触される。得られたビオチン-アビジン複合体は、標的レセプターを固体担体に結合する。

【0080】生体分子をビオチン化する手順は、当該技術分野で周知であり、種々のビオチン試薬は、市販されている。例えば、E. A. Bayerら、Meth. Enzymol. 1990, 184, 51; U. Bickelら、Bioconj. Chem. 1995, 6, 211; H. Hagiwaraら、J. Chromatog. 1992, 597, 331; "Avidin-Biotin Chemistry Handbook" (Pierce, Rockford, ILから入手可能, Catalog Item No. 15055); およびそれらで引用された参考文献を参照せよ。好ましいビオチン試薬は、NHS-LC-ビオチン(Pierceから入手できる)である。このような試薬を用いたビオチン含入の程度は、例えば、DC Schererおよび L. Li, Anal. Chem. 1996, 68, 3382-3387に記載のようなマトリックス補助レーザー脱着/イオン化により、または「Avidin-Biotin C

hemistry Handbook」(Pierce)に記述のような当該技術分野で認められる他の方法により、モニターできる。好ましくは、標的レセプター1個あたり、平均して、約1個～約50個のビオチン、さらに好ましくは、約1個～約10個のビオチンが含まれる。

【0081】このビオチン化標的レセプターは、典型的には、アビジン含有またはストレプトアビジン含有固体担体または関連した物質とカップリングされる。このような担体は市販されており、または当該技術分野で認められる手順により、調製できる。好ましいアビジン含有担体は、Ultralink固定化アビジン(Pierceから入手できる)およびPOROS 20固定化ストレプトアビジン(PerSeptive Biosystemsから入手できる)を含む。このビオチン化標的レセプターは、典型的には、適切な緩衝液(例えば、リン酸緩衝生理食塩水(pH 7))中にて、約4℃～約37℃の範囲の温度で、約0.5～4時間にわたって、レセプターをアビジン含有担体と接触させることにより、この担体とカップリングされる。好ましくは、このビオチン化標的レセプターをアビジン含有担体とカップリングした後、この担体上の任意の残留アビジン結合部位は、この固体担体を過剰の遊離ビオチンと接触させることにより、ブロックされる。

【0082】標的レセプターは、固体担体材料をカラムに導入する前または後のいずれかにて、この固体担体と結合またはカップリングできる。例えば、ビオチン化標的レセプターは、アビジン含有またはストレプトアビジン含有固体担体と接触またはインキュベートでき、そして標的レセプターを含有する得られた固体担体は、引き続いて、カラムに導入される。他方、アビジン含有またはストレプトアビジン含有固体担体は、まず、カラムに導入でき、次いで、ビオチン化標的レセプターをカラムに循環させて、カラムにて、標的レセプターを含有する固体担体が形成される。これらの方法のいずれかまたは、この標的レセプターを固体担体にカップリングする、他の任意の前述の手順と共に、使用できる。

【0083】固体担体材料は、任意の通常の手順を用いて、このカラムに導入できる。典型的には、この固体担体は、適切な希釈剤にスラリー化され、そして得られたスラリーは、このカラムに圧密されるかまたはポンプ上げされる。適切な希釈剤には、例えば、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)溶液のような緩衝液(好ましくは、例えば、アジ化ナトリウムのような防腐剤を含有する)などが挙げられる。

【0084】一般に、この標的レセプターの活性は、本発明で使用するカラムのサイズを決定する。すなわち、この標的レセプターが、単位カラム容量につき、より高い活性を有するときには、より小さいカラム容量が使用できる。典型的には、本発明で使用するカラムは、約10μm～約4.6mmの範囲の内径(i.d.)を有する。好ましくは、カラムの内径は、約100μm～約250μmの範囲であ

る。カラムは、典型的には、その長さが約1cm～約30cm、好ましくは、約2cm～約20cmの範囲である。好ましくは、カラムは、カラム1個あたり、約1pmol～約10nmolの標的レセプター活性部位、さらに好ましくは、カラム1個あたり、約10pmol～約250pmolの標的レセプター活性部位を含有する。

【0085】インジケーター化合物を使用するなら、カラムの長さおよびそのi.d.はまた、インジケーター化合物のK<sub>d</sub>に依存する(すなわち、インジケーターが、標的レセプターへのより高い親和性を有するときには、より小さいカラムが使用できる)。好ましくは、インジケーターを使用するとき、カラムの長さおよびi.d.は、インジケーター化合物が空隙容量後に測定可能な量を溶出するように、選択される。

【0086】本発明で使用するカラムの本体は、いずれの通常のカラム本体材料から構成してもよく、これには、例えば、ポリ(エーテルエーテルケトン)(PEEK)、融合シリカ、シリコンマイクロチップ、ステンレス鋼、ナイロン、ポリエチレン、ポリテトラフルオロエチレン(Teflon)などが含まれる。好ましくは、カラム本体は、ポリ(エーテルエーテルケトン)から構成される。

【0087】標的レセプターを含む固体担体を、カラムに導入するかまたはカラム内で形成した後、カラムは、典型的には、適切な希釈剤でフラッシュされて、任意の未結合標的レセプターまたは不純物が除去される。カラムをフラッシュするのに適切な希釈剤には、例えば、リン酸塩緩衝生理食塩水、TRIS緩衝液などが挙げられる。望ましいなら、未結合標的レセプターまたは不純物の除去を促進するために、この緩衝液には、洗浄剤を含有させてもよい。

【0088】カラムをフラッシュした後、カラムは、典型的には、前端クロマトグラフィーに適切で質量分析と適合する緩衝液を用いて、平衡化される。質量分析に使用するには、一般に、揮発性緩衝液が好ましい。前端クロマトグラフィーのためには、緩衝液は、典型的には、レセプターーリガンドの相互作用を促進するように、選択される。FC-MSで使用するのに適切な緩衝液には、例えば、酢酸アンモニウム、ギ酸アンモニウムなどが挙げられる。

【0089】カラムの平衡化に続いて、化合物ライブラリは、次いで、連続的に、前端クロマトグラフィー条件下にて、カラムに付与される。典型的には、化合物ライブラリは、カラムに付与するとき、適切な希釈剤中の、ライブラリメンバーまたは推定リガンドの溶液を含有する。典型的には、希釈剤は、カラムを平衡化するのに使用する緩衝液である。一般に、希釈剤中のライブラリメンバーの濃度は、約0.01μM～約50μMの範囲である。好ましくは、ライブラリメンバーの濃度は、約0.1μM～約10μMの範囲である。

【0090】前端クロマトグラフィーを行なうプロセス

は、当該技術分野で周知である。例えば、K.-I. Kasai ら、Journal of Chromatography 1986、376、33-47；D. S. Hage ら、Journal of Chromatography B、1997、669、449-525 およびそれらで引用された参考文献を参照せよ。これらの参考文献の開示は、その全体として本明細書中で参考として援用される。典型的には、化合物ライブラリは、標的レセプターを含むカラムに、連続的に付与または注入される。これらの条件下では、標的レセプターは、化合物ライブラリの各メンバーに、連続的に接触または挑戦される。カラムは、化合物ライブラリをカラムに連続的に付与することにより、動的平衡に導かれる。標的レセプターに対して異なる結合定数を有するライブラリメンバーは、このカラムにて、異なる破過時間またはホールドアップ容量を示す。すなわち、標的レセプターへの高い親和性を有するこれらのメンバーは、それらが、初期注入濃度でカラムから溶出するかそれを破過するまでに、カラムでの長い破過時間または高いホールドアップ容量を有する。带状(zonal)クロマトグラフィー法と異なり、前端クロマトグラフィーを用いると、ライブラリメンバーの物理的な分離は起こらない。FC-MS を行なう適切な方法は、弁理士処理番号026579-174 として本願と同日に出願された「Methods for Screening Compound Libraries」の表題の米国特許出願第\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_, 号に記載されており、この出願の開示内容は、その全体について、本明細書中で参考として援用されている。

【0091】前端クロマトグラフィー中では、カラムは、典型的には、約0℃～約90℃、好ましくは、約4℃～約60℃、さらに好ましくは、約20℃～約40℃の範囲の温度にされる。

【0092】リガンドが、標的レセプターへの非常に高い親和性を有するとき、カラムは、FC-MS 分析を行なう前に、化合物ライブラリであらかじめ平衡化するのが望ましい。カラムが平衡に到達することが可能になるのに十分な期間、すなわち、約0.25時間～24時間にわたって、カラムに化合物ライブラリを注入するか、またはカラムに化合物ライブラリを注入し、その流れを止め、そしてこの分析を行なう前に、1日までの期間にわたって、系を平衡化するかはいずれかにより、カラムは、あらかじめ平衡化できる。望ましいなら、一連のストップ-フローサイクルもまた、行なうことができる。

【0093】本発明の装置では、流出液を分析するために、カラムには、質量分析計が連結される。質量分析計は、流出液中に存在するライブラリメンバーの検出および同定の両方を可能にするので、本発明で特に有用である。このことに関して、質量分析計は、ライブラリの溶出メンバーを、それらの質量/電荷比に基づいて、同定する。

【0094】カラムからの流出液を質量分析により分析する前に、流出液は、必要に応じて、補充希釈剤または

「補充流れ」で希釈され、合わせた流れは、例えば、エレクトロスプレー質量分析計に導かれる。典型的には、補充希釈剤は、主要量の有機溶媒および少量の水性緩衝液を含有する。有機溶媒は、安定で効果的なエレクトロスプレーを促進するように、選択される。この補充希釈剤で使用するのに適切な代表的な有機溶媒には、例えば、アセトニトリル、メタノール、イソプロパノールなどが挙げられる。好ましい有機溶媒は、アセトニトリルである。典型的には、使用する補充希釈剤の量は、流出液と補充希釈剤とを合わせた流速が約100μL/分未満となるように調節される。好ましくは、質量分析計に入る合計流速は、約100 nL/分～約20μL/分の範囲である。

【0095】質量分析計を用いて流出液を分析する方法は、当該技術分野で周知である。本発明では、溶液中に存在する成分を直接的または間接的に分析できるいずれのタイプの質量分析計も使用でき、これには、例えば、エレクトロスプレー質量分析計(ES-MS)、大気圧化学電離(APCI)、膜導入質量分析(MIMS)、連続流高速原子衝撃(cf-FAB)、熱噴霧法、粒子ビーム、移動ベルト界面などが含まれる。エレクトロスプレー質量分析は、特に好ましい。エレクトロスプレー質量分析を行なう装置および方法は、例えば、S.J. Gaskell、*「Electrospray: Principles and Practice」*、J. Mass. Spectrom. 1997、32、677-688 およびそれらで引用した参考文献に記載されている。この質量分析計は、いずれのタイプ(すなわち、走査型またはダイナミック型)でもあり得、これには、例えば、四極子、飛行時間、イオントラップ、FTICRなどが含まれる。

【0096】典型的には、質量分析計のパラメーターは、溶出する化合物に対して最も高い感度を与えるように、設定される。一般に、エレクトロスプレー質量分析計を使用するとき、このような調整には、例えば、噴霧圧、乾燥ガス流速、イオン伝達およびエレクトロスプレー針位置の最適化が含まれる。例えば、噴霧圧は、典型的には、約0 psi～約60 psi の範囲であり、そして乾燥ガス流速は、約0 L/分～約50 L/分の範囲である。全イオンクロマトグラムは、典型的には、リアルタイムで測定され記録される。カラムの大きさ、化合物ライブラリの濃度、および流速は、一般に、その走査時間を決定する。典型的な走査時間は、約1分間～約60分間の範囲である。

【0097】前端クロマトグラフィーが完結すると、カラムは、典型的には、競合リガンドと共にまたはそれなしで、大容量の結合緩衝液で洗浄することにより、再生される。このことに関して、本発明の方法の特定の利点は、操作のいずれの時点でも、標的レセプターを変性する必要がないことにある。従って、カラムは、一般に、識別可能な活性損失または標的レセプターの浸出なしに、何回も再使用できる。

【0098】本発明のスクリーニング方法を行なうため

の代表的な装置を、図1に例示する。図1に示すように、緩衝溶液を含む第1レザバ1および化合物ライブラリの緩衝溶液を含む第2レザバ2は、管3を介して、バルブ4に連結されている。図1では、レザバ1および2はシリンジであるが、任意の同様のレザバも使用できる。バルブ4は、レザバ1または2からの溶液を、廃物容器5またはカラム6の流入末端に導くことを可能にする。カラム6は、固相担体、カラム壁に結合しているかまたはその他の方法でカラム内に保持された標的レセプターを含有する。カラム6の流出末端は、混合ティー7に連結され、これはまた、管9を介して、レザバ8(補充希釈剤を含有する)に連結されている。カラム6からの流出液は、混合ティー7にて、レザバ8からの補充希釈剤と混合されて、その流出物は、管10を介して、エレクトロスプレー質量分析計11に導かれる。レザバ1、2および8からの流れを制御するために、ブランチャー12には、例えば、ポンプを介して、圧力が付与される。

【0099】この装置の他の実施態様では、本発明の装置は、化合物ライブラリをスクリーニングして、ライブラリの任意のメンバーが、あらかじめ選択したインジケータ化合物またはインジケータ化合物の混合物の結合を妨害する標的レセプターへの親和性を有するかどうかを決定するために、使用できる。この実施態様では、カラムを化合物ライブラリで平衡化した後、標的レセプターに対して公知の親和性を有するインジケータ化合物の破過時間が決定され、そして化合物ライブラリの存在しない状態でのインジケータ化合物に対する破過時間と比較される。インジケータ化合物が、化合物ライブラリとの平衡後に、より短い破過時間を有するなら、化合物ライブラリは、インジケータ化合物よりも高い、標的レセプターへの全体親和性を有する1種またはそれ以上のリガンドを含有する。インジケータ化合物は、カラムでの比較的短い破過時間を有するように選択できるので、この実施態様の非常に有利な点は、化合物ライブラリが急速に、例えば、5分間未満でスクリーニングされて、標的レセプターへの所定の最小レベルの親和性を有するライブラリが同定できることにある。ライブラリを、標的レセプターへの所定の最小レベルの親和性を有するものとして同定するとき、ライブラリは、FC-MSを用いてさらに分析することができ、そのことにより標的レセプターに結合するリガンドが同定できる。

【0100】インジケータ化合物を使用することの1つの利点は、インジケータ化合物しかモニターする必要がないので、各ライブラリのスクリーニング時間が著しく短縮されることである。さらに、インジケータ化合物は、目的の活性部位にて、標的レセプターと結合するので、インジケータの破過時間の変化は、ライブラリのメンバーがインジケータ化合物と同じ活性部位に結合するときのみ、認められる。従って、標的レセプターへのライブラリの非特異的結合は、間違った指示を

与えない。

【0101】本発明のこの実施態様で使用するインジケータ化合物は、典型的には、標的レセプターへの比較的に弱い親和性を有するように、選択される。これにより、インジケータ化合物は、カラムを急速に溶出するかまたは破過でき、それにより、この流出液をモニターするのに必要な時間が短縮される。化合物ライブラリなしで、カラムの破過時間が約5分間未満のインジケータ化合物が好ましい。他方、標的レセプターへの強い親和性を有するインジケータが使用でき、それにより、より小さいカラムが使用可能となる。強い親和性を有するインジケータ化合物を使用する場合、化合物ライブラリは、典型的には、より高い濃度で、カラムに付与される。化合物ライブラリなしでのインジケータ化合物のカラムでの破過時間は、本明細書で記述のFC-MS法を用いて決定される。インジケータ化合物の標的レセプターへの親和性は、通常の方法(例えば、微小熱量測定など)を用いて、または本発明のFC-MS法を用いて、決定できる。好ましくは、インジケータ化合物はまた、化合物ライブラリのメンバーと比較して、独特の質量を有し、その結果、インジケータ化合物は、質量分析により明らかに同定することができる。一般に、インジケータ化合物および四極子質量分析計を用いると、インジケータ化合物の質量だけがモニターされて、感度が良好となる。

【0102】特定の標的レセプターと共に使用するのに適切なインジケータ化合物の代表的な例には、例えば、Salmonella paratyphi B O-抗原の3,6-ジデオキシ-D-ガラクトース(アベクオース)エпитープを認識するモノクローナル抗体と共に使用するための $\alpha$  Abe(1-3) $\alpha$  Ta1-OCH<sub>3</sub> ( $K_d$  = 0.2 mM)、L-セレクトリンと共に使用するためのフィチン酸(phytic acid) ( $K_d$  = 1  $\mu$ M)などが含まれる。さらに、1種より多いインジケータ化合物を使用してもよい。インジケータはまた、他の分子とカップリングまたは複合体化(conjugate)でき、あるいはその検出を促進する原子または同位体を含有してもよい。例えば、インジケータ化合物は、質量スペクトルが44単位づつ異なるピークを含み、それにより、インジケータ化合物の検出を促進するように、ポリエチレングリコール(PEG)と複合体化できる。

【0103】インジケータ化合物を用いると、その破過時間は、まず、このインジケータ化合物を、前端クロマトグラフィー条件下にて、標的レセプターを含むカラムに付与することにより、決定される。このカラムは、次いで、典型的には、スクリーニングする化合物ライブラリで平衡化される。一般に、この化合物ライブラリは、このライブラリのメンバーの全てをこのカラムに破過させるのに十分な時間にわたって、このカラムに付与されるかまたは注入される。ある場合、例えば、非常に強い結合リガンドが存在する場合には、このライブラ

りの全てのメンバーが平衡に達するわけではない。この期間中には、その溶出液は、分析のために、質量分析計に供給でき、または再使用または廃棄用に回収できる。一旦、このカラムがこの化合物ライブラリで平衡化(または部分平衡化)されると、この化合物ライブラリおよびインジケータ化合物を含有する混合物は、本明細書で記述の前端クロマトグラフィー操作を用いて、このカラムに付与または注入される。好ましくは、このインジケータ化合物は、この混合物中にて、約1 nM~約10 μMの範囲の量で、さらに好ましくは、約10 nM~約100 nMの範囲の量で存在する。このカラムからの溶出液は、このインジケータ化合物のこの化合物ライブラリ平衡カラムへの破過時間を決定するために分析され、この時間は、このインジケータ化合物の所定の破過時間と比較されて、この化合物ライブラリが、このインジケータ化合物と比較して、この標的レセプターへのより高い親和性を有するかどうかを確認される。

【0104】他方、このカラムをこの化合物ライブラリで平衡化した後、このインジケータ化合物は、単独で、このカラムに付与または注入できる。この方法によれば、非常に強く結合したリガンドまたは緩慢な排出速度のものを検出することが可能となる。

【0105】このインジケータ化合物を質量分析を用いて検出することに加えて、他の検出方法を使用することもまた、考慮される。例えば、インジケータ化合物は、このカラムからの溶出液中で、例えば、蛍光、赤外吸収、UV-可視吸収、核磁気共鳴(NMR)、原子スペクトル(すなわち、AAS、ICP-OESなど)、フローサイトメトリーなどを用いて、検出できる。

【0106】本発明の装置によれば、各カラムを断続的にモニターする単一の質量分析計を用いて、複数のFC-MS分析を同時に行なうことが可能となる。「捕捉および解放」方法(これは、典型的には、各リガンドに対する溶出ピークまたは「スパイク」を提供する)と異なり、FC-MSは、絶え間ない溶出液のモニターを必要としない。これは、一旦、ライブラリメンバーがこのカラムを破過すると、そのメンバーは、引き続いて、この溶出液中に存在し、そして質量分析計により検出できるからである。従って、各カラムを断続的にモニターする単一の質量分析計を用いて、複数のFC-MS分析を同時に行なうことができる。例えば、本発明を用いると、少なくとも約100個のカラムを同時に操作できる。

【0107】複数のカラムを使用すると、各カラムは、典型的には、次のカラムへと切り替える前に、短時間にわたってモニターされる。例えば、四極子質量分析計を用いると、各カラムは、典型的には、次のカラムに切り替える前に、約0.5秒間~約10秒間、好ましくは、約1秒間~約5秒間にわたって、順次、モニターされる。各カラムからの溶出液は、質量分析計を用いて、本明細書で記述のように分析される。一般に、複数のカラムから

得た全てのデータを収集するには、単一の走査ファイルが使用され、それにより、複合全イオンクロマトグラムが作成される。引き続いて、カラムの切り替えと質量分析データの獲得とを同時に行なうことにより、各カラムについて、別の全イオンクロマトグラムが再作成される。

【0108】好ましい実施態様では、各カラムは、このカラム溶出液のエレクトロスプレー質量分析計への注入のために、個々のエレクトロスプレー針を有する。速く反復的な針前進シーケンスを可能にする複数のエレクトロスプレー針のいずれかの幾何学的な配列が使用できる。複数の溶出液をエレクトロスプレー質量分析計に注入するために適当な装置は、弁理士処理番号026579-176として本願と同日に出願された「Device for Delivery of Multiple Liquid Sample Streams to a Mass Spectrometer」の表題の米国特許出願第\_\_\_\_\_号に記載されており、この出願の開示内容は、その全体が本明細書中で参考として援用されている。他方、線形移動列のエレクトロスプレー針(噴霧器)などを使用してもよい。例えば、Q. Xueら、Anal. Chem. 1997, 69, 426-430およびそこに引用されている参考文献を参照せよ。これらの開示内容は、本明細書中で参考として援用されている。

【0109】複数のカラムを用いて化合物ライブラリをスクリーニングする代表的な装置を、図2に例示する。図2に示すように、複数のカラム13の各カラムは、管14および混合ティー15を介して、化合物ライブラリの結合緩衝溶液を含む第1レザバ16および結合緩衝液を含む第2レザバ17に連結されている。図2では、レザバ16および17はシリンジであるが、いずれの類似のレザバも使用できる。各カラム13は、固相担体に結合した標的レセプターを含有する。レザバ17中の緩衝溶液は、この化合物ライブラリの導入前後に、カラム13を洗浄するために使用される。各カラム13の流出末端は、混合ティー18に連結され、これはまた、管20を介して、レザバ19(補充希釈剤を含有する)に連結されている。各カラム13からの溶出液は、混合ティー18にて、レザバ19からの補充希釈剤と混合されて、その流出物は、管20およびバルブ21を経て、電気動作マルチポート選択バルブ23を介して、エレクトロスプレー質量分析計22に導かれ、または廃物/回収容器24に導かれる。レザバ16、17および19からの流れを制御するために、ブランチャー25には、例えば、ポンプを介して、圧力が付与される。

【0110】他方、図3に例示する他の実施態様では、混合ティー18からの流出物は、質量分析のために、管20を介して、個々のエレクトロスプレー針26へと導くことができる。

【0111】インジケータ化合物を用いて化合物ライブラリを評価するために、複数のカラムを使用すると、各カラムの走査時間が比較的短い(すなわち、1カラムあたり、典型的には、約3分間)ので、各カラムは、

所望であれば、順次走査できる。インジケータ化合物を用いると、複数のカラムの連続走査は、それによってこのインジケータ化合物の保持時間をさらに正確に決定できるので、有利であり得る。

【0112】複数のカラムを用いて、インジケータ化合物と共に、化合物ライブラリを順次スクリーニングする代表的な装置を、図4に例示する。図4で示すように、複数のレザバ27(例えば、シリンジ)は、クランプ28で、一定位置に保持されている。各レザバ27は、適当な希釈剤中の化合物ライブラリおよびインジケータ化合物の混合物(または、代わりに、単に、このインジケータ)を含有する。各レザバ27の末端は、管29を介して、固相担体に結合した標的レセプターを含有するカラム30の流入末端に連結されている。各カラム30の流入末端は、管31を介して、電気動作マルチポート流れ選択バルブ32に連結され、これは、カラム30からの溶出液の流れを制御する。バルブ32を用いると、これらのカラムからの溶出液は、管34を介して、廃物容器33に導かれるか、または管36を介して、混合ティール35に導かれ得る。混合ティール35はまた、管37を介して、補充希釈剤を含有するレザバ36に連結されている。各カラム30からの溶出液は、混合ティール35にて、レザバ36からの補充希釈剤と混合され、その流出物は、管38を介して、エレクトロスプレー質量分析計39に導かれる。レザバ27からカラム30への流れを制御するために、孤立ブロック40を使用してよい。例えば、ポンプを介して、孤立ブロック40に圧力を付与すると、各レザバ27のプランジャー41は、個々に、順次低下して、それにより、このレザバの内容物は、管29を介して、対応するカラム30へと注入される。各カラム30から発生する溶出液は、順次、分析用の質量分析計39へと導かれる。

【0113】本発明の装置はまた、化合物ライブラリの一定の個々のメンバーの絶対親和性または解離定数 $K_d$ を容易に決定できる。このことに関して、この標的レセプターへの親和性を有するリガンドは、以下の等式に従って、その濃度および $K_d$ 値に関連した容量(すなわち、破過時間)で、このカラムを破過する：

【0114】

【数1】

$$V_x - V_0 = \frac{B_t}{[X]_0 + (K_d)_x}$$

ここで、 $B_t$ は、このカラムの動的結合能を表わす； $[X]_0$ は、リガンドの化合物ライブラリへの注入濃度である； $K_d$ は、リガンドの解離定数である； $V_0$ は、空隙容量である；そして $V_x$ は、リガンドの破過に対応する前面の中間点での容量を表わす。この簡単な等式は、一旦、 $B_t$ およびリガンド濃度が既知となると、その $V_x - V_0$ を1回測定することから、リガンドの解離定数が決定できることを意味している。

【0115】 $B_t$ を決定するために、代表的な化合物(例

えば、化合物X)は、種々の濃度で、このカラムに注入され、対応する $V_x - V_0$ 値が測定される。 $([X](V_x - V_0))^{-1}$ 対 $[X]^{-1}$ のプロットが作成され、ここで、 $y$ -切片は、このカラムの動的結合能( $B_t$ )を意味する(Lineweaver-Burkプロットと類似している)。

【0116】一旦、このカラムの動的結合能が決定されると、この化合物ライブラリの個々のメンバーの解離定数は、1回のFC-MS走査から決定できる。例えば、化合物に対する $K_d$ (ここで、 $[X] \ll (K_d)_x$ )は、 $B_t/(V_x - V_0)$ から容易に決定される。このライブラリのうち解離定数の低いメンバーについては、 $K_d$ を決定するには、それらの濃度を知るか、またはこの化合物ライブラリを高い希釈割合で注入する必要がある。

【0117】以下の実施例は、本発明を例示するために提供されており、いずれの様式でも、本発明の範囲を限定するものとしては解釈されない。他に述べられていなければ、全ての温度は摂氏である。

【0118】

【実施例】以下の実施例では、以下の略語は、以下の意味を有する。略語を定義していないなら、それは、一般に受け入れられている意味を有する。

【0119】

$B_t$  = 動的結合能

°C = 摂氏

cm = センチメートル

eq. = 当量

FAB = 高速原子衝撃

FC = 前端クロマトグラフィー

g = グラム

$K_d$  = 解離定数

L = リットル

MALDI = マトリックス補助レーザー脱着/イオン化

meq. = ミリ当量

mq = ミリグラム

mL = ミリリットル

mM = ミリモラー

mmol = ミリモル

MS = 質量分析

m/z = 質量電荷比

N = 規定度

PBS = リン酸塩緩衝化生理食塩水

PEEK = ポリ(エーテルエーテルケトン)

pmol = ピコモル

TIC = 全イオンクロマトグラム

$\mu$ g = マイクログラム

$\mu$ L = マイクロリットル

$\mu$ m = マイクロメートル

$\mu$ M = マイクロモラー

$V_0$  = 空隙容量

(実施例1) FC-MSを用いたオリゴ糖ライブラリのス

10

20

30

40

50

### クリーニング

本実施例では、6種のオリゴ糖の混合物を含有する化合物ライブラリを、エレクトロスプレー質量分析計と組み合わせた前端クロマトグラフィーを用いてスクリーニングして、モノクローナル抗体(これは、*Salmonella paratyphi* B O-抗原の3,6-ジデオキシ-D-ガラクトース(アベクオース)エピトープを認識する)へのオリゴ糖の相対親和性を決定した。

【0120】この化合物ライブラリは、以下の6種のオリゴ糖からなっていた： $\alpha$ GalNAc(1→3) $\beta$ Gal-OG(化合物1)； $\alpha$ Gal(1→3)[ $\alpha$ Fuc(1→2)] $\beta$ Gal-OG(化合物2)； $\alpha$ Man(1→3)[ $\alpha$ Man(1→6)] $\beta$ Man-OG(化合物3)； $\alpha$ Abe(1→3) $\alpha$ Tal-OMe(化合物4)； $\alpha$ Gal(1→2)[ $\alpha$ Abe(1→3)] $\alpha$ Man-OMe(化合物5)；および $\alpha$ Glc(1→4) $\beta$ Glc(1→4) $\alpha$ Gal(1→2)-[ $\alpha$ Abe(1→3)] $\alpha$ Man(1→3) $\alpha$ Glc(1→4) $\beta$ Glc-OMe(化合物6)。ここで、Grは $O(CH_2)_6CO_2CH_3$ である。化合物1～3は、それぞれ、1987年12月7日にR.U. Lemieuxらに発行された米国特許第4,362,720号；1979年1月30日にR.U. Lemieuxらに発行された米国特許第4,137,401号；およびK.J. Kaurらの「Use of N-Acetylglucosaminyltransferases I and II in the Preparative Synthesis of Oligosaccharides」、Carbohydr. Res. 1991, 210, 145-153に記載の手順を用いて得られ、これらの開示内容は、それらの全体が本明細書中で参考として援用されている。化合物4～6は、D.R. Bundleら、「Modulation of Antibody Affinity by Synthetic Modifications of the Most Exposed Pyranose Residue of A Trisaccharide Epitope」、Bioorg. Med. Chem. 1994, 2, 1221-1229に記載の手順を用いて得られ、その開示内容は、その全体が本明細書中で参考として援用されている。化合物1～3は、この抗体に対する特異性がないことが知られている。他方、化合物4～6は、認識のための最小必要条件(アベクオース)を含み、この抗体への一定範囲に及ぶ親和性を有する。化合物4～6に対する $K_d$ 値を、滴定マイクロ熱量測定により測定し、以下の表1に示す。

【0121】この実験で使用するモノクローナル抗体は、D.R. Bundleら、「Molecular Recognition of a *Salmonella* Trisaccharide Epitope by Monoclonal Antibody Se155.4」Biochem. 1994, 33, 5172-5182に記載のようにして、生成した。この抗体(0.5 mg)を、長鎖スパーサーアームを含むビオチン試薬(NHS-LCビオチン、Pierce)でビオチン化した。ビオチン取込みの程度は、マトリックス補助レーザー脱着/イオン化によりモニターし、その反応は、14ビオチン/IqG(平均)で停止した。次いで、このビオチン化抗体を、重炭酸塩緩衝液(pH 8.5)中にて1時間にわたり、Ultralink固定化アビジン(Pierce, Cat. No. 53119)25 $\mu$ Lでインキュベートすることにより、ビーズ担体と結合させた。これらのビーズを、次

いで、この重炭酸塩緩衝液で十分に洗浄した。UV定量化により、約45 $\mu$ g抗体/25 $\mu$ Lビーズの固定化が得られたことが明らかとなった。このビーズを、次いで、内径500 $\mu$ m×11.5 cmのポリ(エーテルエーテルケトン)(PEEK)カラム本体(約23 $\mu$ Lカラム容量)にスラリー充填した。

【0122】この実験では、混合ティーは、カラム溶離液および有機補充流れ用のカラム末端固定室および混合室として、二重の役割を果たした。このカラムを、次いで、エレクトロスプレー質量分析計(Hewlett-Packardシリーズ1100 MSD、単一四極子)に直接連結した。

【0123】前端クロマトグラフィーモードで操作するために、カラムは、まず、酢酸アンモニウム緩衝液( $NH_4OAc$ , 2 mM, pH 6.7)でフラッシュした。フラッシュ後、この流れを、酢酸アンモニウム緩衝液中に6種のオリゴ糖(それぞれ、1 $\mu$ Mで存在する)の混合物を含有する第2溶液に切り替えた。全ての溶液は、8 $\mu$ L/分/シリンジ(1 ccシリンジ)の流速で、多シリンジポンプ(PHD 200, Harvard Apparatus)を用いて同時に注入した。流れの切り替えには、Rheodyneバルブ(Model 9725)を使用した。このカラム溶出液を、このティーにて、この補充流れ(アセトニトリル中の10% 2 mM  $NH_4OAc$ 緩衝液)と合わせて、16 $\mu$ L/分の流速で質量分析計に入れた。

【0124】この混合物を分析するために、この質量分析計を、 $m/z$  100から $m/z$  1500まで走査した。陽イオン検出の走査モードで、データを集めた。図5Aに示すように、50分間の走査時間から、全イオンクロマトグラム(TIC)を作成した。これは、僅か400 pmolの各オリゴ糖の消費を表わしていた。次いで、特定の $m/z$ 値におけるピークを、このTICを生じる質量スペクトルの分析により同定し、図5Bに示したTICから、6個の化合物の全ての選択イオンクロマトグラムを再作成した。化合物1～3は、実線で示したように、このカラムを同時に破過した。次いで、図5C、5Dおよび5Eに示したTIC(I、IIおよびIIIの時点)の時間部分から、質量スペクトルを作成した。これらの質量スペクトルは、種々のオリゴ糖のこのカラムを通しての進行を図示している。化合物4の破過開始を表わすスペクトルは、示していない。

【0125】上で述べたように、この標的レセプターへの親和性がないリガンドは、その空隙容量( $V_o$ )で破過するのに対して、この標的レセプターへの親和性がある化合物は、以下の等式に従って、その濃度および $K_d$ 値に関連した容量で、遅れて破過する：

【0126】

【数2】

$$V_x - V_o = \frac{B_x}{[X]_0 + (K_d)_x}$$

ここで、 $B_x$ は、このカラムの動的結合能を表わす； $[X]_0$ は、リガンドの化合物ライブラリへの注入濃度である； $K_d$ は、リガンドの解離定数である； $V_o$ は、空隙容量である；そして $V_x$ は、リガンドの破過に対応する

前面の中間点での容量を表わす。

【0127】 $B_t$ を決定するために、化合物5を、種々の濃度でこのカラムに注入し、対応する $V-V_0$ 値を測定した。 $([A]_0(V-V_0))^{-1}$ 対 $[A]_0^{-1}$ のプロットが作成され、ここで、 $A$ は、図6で示すように、化合物5である。 $y$ -切片は、520 pmolの $B_t$ を示した。各抗体分子は、2個の結合部位を有し、従って、これは、タンパク質260 pmolの活性に相当する(これは、結合したタンパク質の全量の93%を表わす)。その $x$ -切片は、化合物5に対する11.2  $\mu$ Mの $K_d$ を意味し、これは、表1で示す

マイクロ熱量測定により決定した値に匹敵する。  
【0128】混合物のスクリーニング前に、このカラムの能力を知ることにより、単一の前端クロマトグラムから、解離定数が決定できる。 $[X] \ll (K_d)_x$ の化合物については、その $K_d$ は、 $B_t/(V-V_0)$ から容易に決定で\*

No.	オリゴ糖 <sup>1</sup>	(MNa) <sup>+</sup>	$K_d$ <sup>2</sup>	
			文献値	FC/MS
1	$\alpha$ GalNAc(1-3) $\beta$ Gal-OGr	576.3	—	—
2	$\alpha$ Gal(1-3)[ $\alpha$ Fuc(1-2)] $\beta$ Gal-OGr	681.3	—	—
3	$\alpha$ Man(1-3)[ $\alpha$ Man(1-6)] $\beta$ Man-OGr	697.3	—	—
4	$\alpha$ Abe(1-3) $\alpha$ Tal-OCH <sub>3</sub>	347.0	$1.9 \times 10^{-4}$	$1.6 \times 10^{-4}$
5	$\alpha$ Gal(1-2)[ $\alpha$ Abe(1-3)] $\alpha$ Man-OCH <sub>3</sub>	509.2	$6.3 \times 10^{-6}$	$1.1 \times 10^{-5}$
6	$\alpha$ Glc(1-4) $\beta$ Glc(1-4) $\alpha$ Gal(1-2)[ $\alpha$ Abe(1-3)] $\alpha$ Man(1-3) $\alpha$ Glc(1-4) $\beta$ Glc-OCH <sub>3</sub>	1157.4	$8.8 \times 10^{-7}$	$1.5 \times 10^{-6}$

<sup>1</sup> Gr = O(CH<sub>2</sub>)<sub>8</sub>CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>.

<sup>2</sup>  $K_d$  = 解離定数.

表1の結果は、化合物ライブラリの種々の推定リガンドの標的レセプターへの親和性がこのライブラリの他の推定リガンドと比較して決定できること、そして推定リガンドおよび標的レセプターに対する解離定数 $K_d$ が決定できることを立証している。これらの結果は、さらに、文献 $K_d$ 値とFC-MS操作によって作成した $K_d$ 値との間に、適当な相関があることを立証している。

【0132】(実施例2) FC-MSおよびインジケーター化合物を用いたオリゴ糖ライブラリのスクリーニング  
本実施例では、化合物ライブラリをスクリーニングするためのインジケーター化合物の使用を示す。本実施例で使用した抗体は、実施例1で使用したものと同一、すなわち、Salmonella paratyphi B O-抗原の3,6-ジデオキシ-D-ガラクトース(アベクオース)エピトープを認識するモノクローナル抗体であった。そのカラムもまた、実施例1のカラムと実質的に同じであり、本明細書で記述のように調製しそして操作した。

【0133】この実験では、3種の溶液を調製した。溶液Aは、2 mMのNH<sub>4</sub>OAc中に以下の4種のオリゴ糖を含有していた： $\alpha$ GalNAc(1  $\rightarrow$  3) $\beta$ Gal-OGr(化合物1)； $\alpha$ Gal(1  $\rightarrow$  3)[ $\alpha$ Fuc(1  $\rightarrow$  2)] $\beta$ Gal-OGr(化合物2)； $\alpha$ Man(1  $\rightarrow$  3)[ $\alpha$ Man(1  $\rightarrow$  6)] $\beta$ Man-OGr(化合物

\* きる。例えば、化合物4は、図5Bのクロマトグラムから決定したように、0.2 mMの $K_d$ を有することが明らかとなった。低い解離定数の化合物は、その $K_d$ を決定するためには、その濃度を知るかまたはこの混合物を高い希釈割合で注入する必要がある。化合物6の $K_d$ は、1  $\mu$ Mの濃度では、同じクロマトグラムから、1.5  $\mu$ Mであることが分かった。

【0129】このカラムを、大量の結合緩衝液で洗浄することにより、系外で再生した。本実施例で使用したカラムを、150回の走査にかけたところ、活性の損失または抗体の浸出は認められなかった。

【0130】この実験から得た結果を、表1に示す。

【0131】

【表1】

物3)； $\alpha$ Abe(1  $\rightarrow$  3) $\alpha$ Tal-OCH<sub>3</sub>(化合物4)、ここで、GrはO(CH<sub>2</sub>)<sub>8</sub>CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>である。溶液Bは、2 mMのNH<sub>4</sub>OAc中に $\alpha$ Gal(1  $\rightarrow$  2)[ $\alpha$ Abe(1  $\rightarrow$  3)] $\alpha$ Man-OCH<sub>3</sub>(化合物5)を含有しており、そして溶液Cは、2 mMのNH<sub>4</sub>OAc中に化合物1~5を含有していた。全ての溶液中では、化合物1、2および3は、1  $\mu$ Mで存在しており、化合物4は、0.16  $\mu$ Mで存在しており、そして化合物5は、1.5  $\mu$ Mで存在していた。本実施例では、化合物4は、インジケーター化合物として使用し、そして化合物5は、化合物ライブラリの1メンバーを代表するように使用した。残りの化合物は、 $V_0$ を決定するために使用した。

【0134】化合物1~4を含有する溶液Aを、実施例1に記述したカラムに注入した。この溶出液をモニターするために、四極子質量分析計を使用した。この質量分析計は、各化合物の(M+Na)<sup>+</sup>ピークにて、選択イオンモニター(SIM)モードで操作した。図5Aは、化合物1~4(すなわち、溶液A)の注入から作成した選択イオンクロマトグラムを示す。化合物4の破過容量は、3.0 $\pm$ 0.1  $\mu$ Lであった。このカラムを、結合緩衝液(すなわち、2 mMのNH<sub>4</sub>OAc)で約10分間フラッシュすることにより再生し、その時点で、化合物4の実質的に全ての痕跡を取り除いた。



【0135】図1の装置を用いて、溶液B(化合物5)および溶液C(化合物1~5)を、別個のシリンジに充填した。化合物5の動的平衡が達成されるまで、溶液Bをこのカラムに注入した。この時点で、この流れを、溶液Cを保持するシリンジに切り替え、四極子質量分析計を用いて、図7Bの選択イオンクロマトグラムを作成した。図7Bに示すように、このカラムを化合物5であらかじめ平衡化することにより、インジケータ化合物4の破過容量において、 $(1.1 \pm 0.3 \mu\text{L})$ までの測定可能なシフトが生じる。このことは、化合物5が、この抗体に対して、インジケータ化合物4よりも低い $K_d$ を有するリガンドであるという事実と一致している(上記表1を参照)。従って、このインジケータ化合物を単にモニターすることにより、この代表的なライブラリは、この標的レセプターへの高い親和性を有する化合物を含むという事実が、容易に明らかとなる。

【0136】この実験でのインジケータ化合物(化合物4)を、代表的なライブラリ(化合物5)の溶液に添加したが、このことは必ずしも必要ではないことを記しておく。このライブラリ(溶液B)が、強く保持された化合物(すなわち、低い $K_d$ すなわち排出速度)を含む状況では、溶液Cを溶液Aで置き換えてもよい(すなわち、このインジケータを、このライブラリと混合する必要はない)。

#### 【0137】(実施例3) FC-MSを用いたオリゴ糖ライブラリのスクリーニング

本実施例では、4種のオリゴ糖の混合物を含む化合物ライブラリを、エレクトロスプレー質量分析計と組み合わせた前端クロマトグラフィーを用いてスクリーニングして、これらのオリゴ糖の、コレラ毒素Bサブユニットへの相対親和性を決定した。

【0138】この化合物ライブラリは、以下の4種のオリゴ糖からなっていた： $\alpha\text{-GalNAc}(1 \rightarrow 3)\beta\text{-Gal-OGr}$ (化合物1)； $\alpha\text{-Gal}(1 \rightarrow 3)[\alpha\text{-Fuc}(1 \rightarrow 2)]\beta\text{-Gal-OGr}$ (化合物2)； $\alpha\text{-Man}(1 \rightarrow 3)[\alpha\text{-Man}(1 \rightarrow 6)]\beta\text{-Man-OGr}$ (化合物3)；および $\text{GM}_1$ オリゴ糖(化合物7、ここで、 $\text{Gr}$ は $\text{O}(\text{CH}_2)_6\text{CO}_2\text{CH}_3$ である)。化合物7は、コレラ毒素Bサブユニットに対する天然リガンドであり、A. Schonら、「Thermodynamics of Intersubunit Interactions in Cholera Toxin upon Binding to the Oligosaccharide Portion of Its Cell Surface Receptor, Ganglioside  $\text{GM}_1$ 」*Biochem.* 1989, 28, 5019-5024に記述の操作を用いて得、その開示内容は、その全体が本明細書中で参考として援用されている。コレラ毒素Bサブユニットは、LIST Biochemicals, Campbell, CAから得た。

【0139】0.01インチ(250 $\mu\text{m}$ )の内径のPEEK管の12 cm部分から、カラムを作成した(約6 $\mu\text{L}$ のカラム容量)。このカラムに、POROS 20固定化ストレプトアビジン粒子(Perseptive Biosystems, Framingham, MAから入手できる)を充填した。

【0140】コレラ毒素Bサブユニット(五量体タンパク質)をビオチン化して、MALDIで測定した約1個~2個のビオチン/モノマーを得た。このビオチン化タンパク質の希釈溶液(4 $\mu\text{M}$ )を、結合したコレラ毒素Bサブユニットの全量が、洗浄後、およそ200 pmoI(UV定量により決定した)になるように、あらかじめ充填したカラムに注入した。

【0141】化合物1~3および7を含有する溶液を調製した。全ての化合物は、2 mM  $\text{NH}_4\text{OAc}$ (pH 6.9)中に2 $\mu\text{M}$ で存在した。図1で示したものと類似の装置を用いて、このカラムを、まず、結合緩衝液(2 mMの $\text{NH}_4\text{OAc}$ )で平衡化した。次いで、化合物1~3および7を含有する溶液を、8 $\mu\text{L}/\text{分}$ で、このカラムに注入した。その溶出液を、典型的な補充流れ(アセトニトリル中の10% 2 mM  $\text{NH}_4\text{OAc}$ )と合わせて、エレクトロスプレー単一四極子質量分析計に通した。負イオン検出を用いて、データを走査モードで集めた。

【0142】全イオンクロマトグラムを作成し、続いて、図8に示すように、化合物1~3および7のそれぞれについて、選択イオンクロマトグラムを再構成した。図8で例示したように、化合物1~3は、この系の空容量で破過した(約4分間 $\times$ 8 $\mu\text{L}/\text{分}$ =32 $\mu\text{L}$ )のに対し、化合物7( $\text{GM}_1$ オリゴ糖)は、約300 $\mu\text{L}$ で破過した。それゆえ、 $\text{GM}_1$ オリゴ糖( $K_d$ =100 nM)は、化合物1~3よりも強い、コレラ毒素Bサブユニットへの親和性を有しており、化合物1~3は、コレラ毒素Bサブユニットに対して、ほとんどまたは全く親和性がない。

【0143】次いで、この結合緩衝液中にて、第2混合物を調製し、類似の様式で、FC-MSにより分析した。この混合物は、合成的に調製した $\text{GM}_1$ アナログ、すなわち、 $\beta\text{-Gal}(1 \rightarrow 3)\beta\text{-GalNAc}(1 \rightarrow )-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-(\leftarrow 2)\alpha\text{-Neu5Ac}$ (化合物8)を、不純形態(すなわち、未確認の中間体および反応副生成物を含有する)で含有していた。化合物8は、P. Fqedら、「A Novel Promoter for the Efficient Construction of 1,2-trans Linkages in Glycoside Synthesis, Using Thioglycosides as Glycosyl Donors」*Carbohydr. Res.* 1986, 149, C9-C12; A. Marraら、「Stereoselective Synthesis of 2-Thioglycosides of N-Acetylneuraminic Acid」, *Carbohydr. Res.* 1989, 187, 35-42; および L. Layら、「Synthesis of the Propyl Glycoside of the Trisaccharide  $\alpha\text{-L-Fuc1p0}-(1 \rightarrow 2)-\beta\text{-D-Gal1p0}-(1 \rightarrow 3)-\beta\text{-D-Gal1p0 NAc}$ . Components of a Tumor Antigen Recognized by the Antibody Mbr1」*Helv. Chim. Acta.* 1994, 77, 509-514; に記載の方法により調製され、その開示内容は、その全体が本明細書中で参考として援用されている。この混合物を、このカラムに注入し、この質量分析計を、化合物3および8を代表する負イオン上にて、選択イオンモニターモードで操作するように設定した。図9に示すようにこれらのイオンについて、選択イオンク

ロマトグラムを作成した。図9は、化合物3が、空隙容量( $m/z$  673.2)で破過したことを示す。質量/電荷が717.2 uのイオンについては、さらに複雑なパターンが認められた。これらのイオンの一定の断片もまた、空隙容量(約25%)で破過したのに対して、残りの75%は、著しく遅れて破過した(約11分)。このツーフロントプロフィール(two-front profile)は、コレラ毒素Bサブユニットに結合していない同質量不純物が、25%のレベルで存在していることを示している。それゆえ、FC-MSは、同質量の非結合不純物の存在を確認できる。これらの不純物の合理的に正確な定量化もまた、達成できる。

【0144】

【発明の効果】本発明によれば、質量分析計と組み合わせた前端クロマトグラフィーを用いて、化合物のライブラリを迅速にスクリーニングし、それによって、標的レセプターに結合するライブラリメンバーを同定し、分類することが可能となった。

【0145】前述の記述から、この組成物および方法の種々の改良および変更は、当業者に想起される。添付の請求の範囲に入るこのような改良の全ては、本発明に含まれることを意図している。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、質量分析計と組み合わせた前端クロマトグラフィーを用いる、化合物ライブラリをスクリーニングするための代表的な装置を例示する。

【図2】図2は、質量分析計と組み合わせた複数の前端クロマトグラフィーカラムを用いる、化合物ライブラリをスクリーニングするための代表的な装置を例示する。

【図3】図3は、質量分析計と組み合わせた複数の前端クロマトグラフィーカラムを用いる、化合物ライブラリをスクリーニングするための別の代表的な装置を例示する。

【図4】図4は、質量分析計と組み合わせた複数の前端クロマトグラフィーカラムを用いる、インジケータ化合物を用いて化合物ライブラリを連続的にスクリーニングするための代表的な装置を例示する。

【図5A】図5Aは、*Salmonella paratyphi* B O-抗原中の3,6-ジデオキシ-D-ガラクトース(アベクオース(abequose))エпитープを認識する炭水化物結合抗体への種々の親和性を有する代表的な6種のオリゴ糖を用いて、\*40

\* FC-MS走査から得られた全イオンクロマトグラム(TIC)を示す。

【図5B】図5Bは、図5Aで示したTICから再構成された、6種のオリゴ糖についての選択イオンクロマトグラムを示す。

【図5C】図5Cは、図5Aで示したTICのタイムスライスから作成した質量スペクトルを示す。

【図5D】図5Dは、図5Aで示したTICのタイムスライスから作成した質量スペクトルを示す。

【図5E】図5Eは、図5Aで示したTICのタイムスライスから作成した質量スペクトルを示す。

【図6】図6は、 $\alpha$ -Gal(1  $\rightarrow$  2)[ $\alpha$ -Abe(1  $\rightarrow$  3)] $\alpha$ -Man-OMeについての $([A]_0(V-V_0))^{-1}$ 対 $[A]_0^{-1}$ のプロットを示す。

【図7A】図7Aは、化合物ライブラリ非存在下で、インジケータ化合物を用いたFC-MS走査から得られた選択イオンクロマトグラムを示す。

【図7B】図7Bは、化合物ライブラリ存在下で、インジケータ化合物を用いたFC-MS走査から得られた選択イオンクロマトグラムを示す。

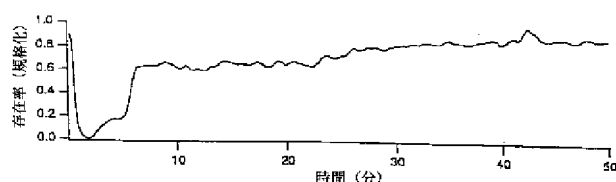
【図8】図8は、コレラ毒素Bサブユニットへの種々の親和性を有する4種の代表的なオリゴ糖を用いて、FC-MS走査から得られた選択イオンクロマトグラムを示す。

【図9】図9は、合成的に調製したGM<sub>4</sub>アナログを用いたFC-MS走査から得られた選択イオンクロマトグラムを示す。

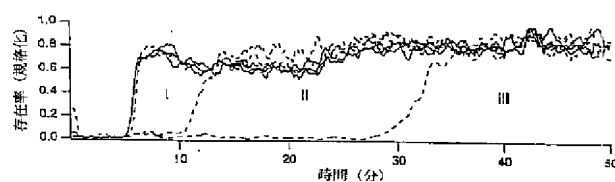
【符号の説明】

1、16	第1 レザバ
2、17	第2 レザバ
3、19	第3 レザバ
5、24、33	廃物容器
6、13、30	カラム
11、22、39	エレクトロスプレー質量分析計
27	レザバ
36	補充希釈剤を含むレザバ
26	エレクトロスプレー針
32	電気作動マルチポート流れ選択バルブ

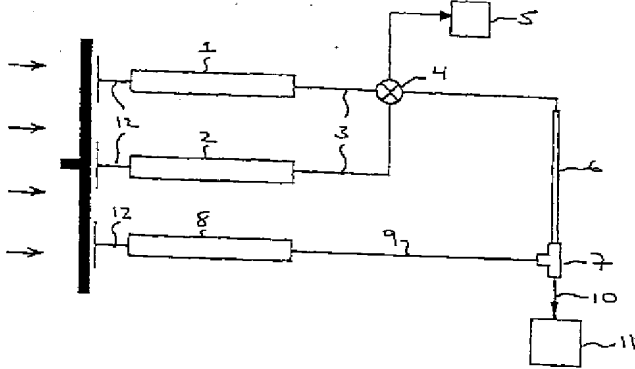
【図5A】



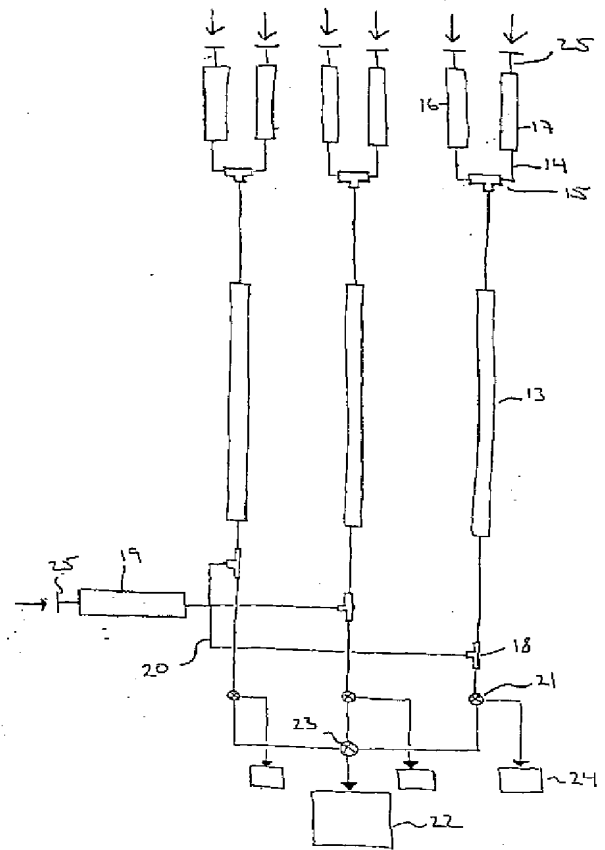
【図5B】



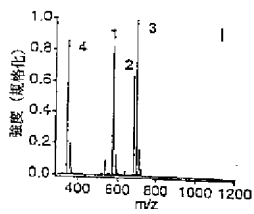
【図1】



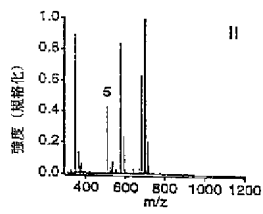
【図2】



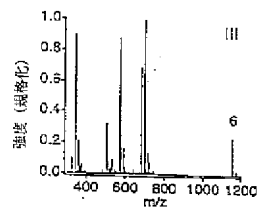
【図5C】



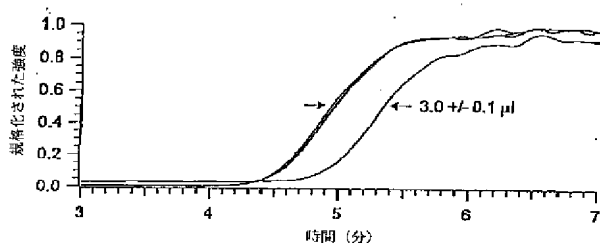
【図5D】



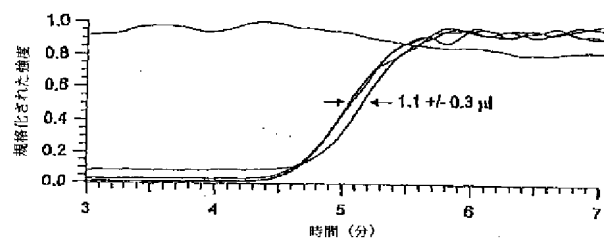
【図5E】



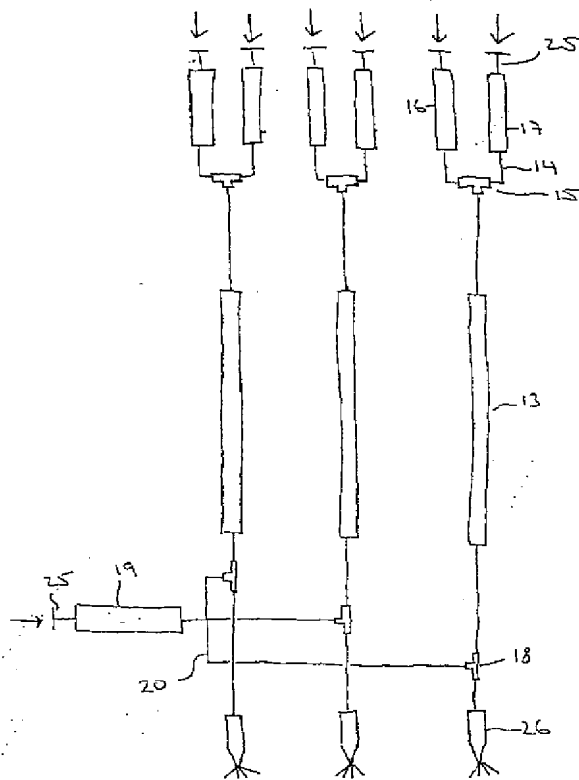
【図7A】



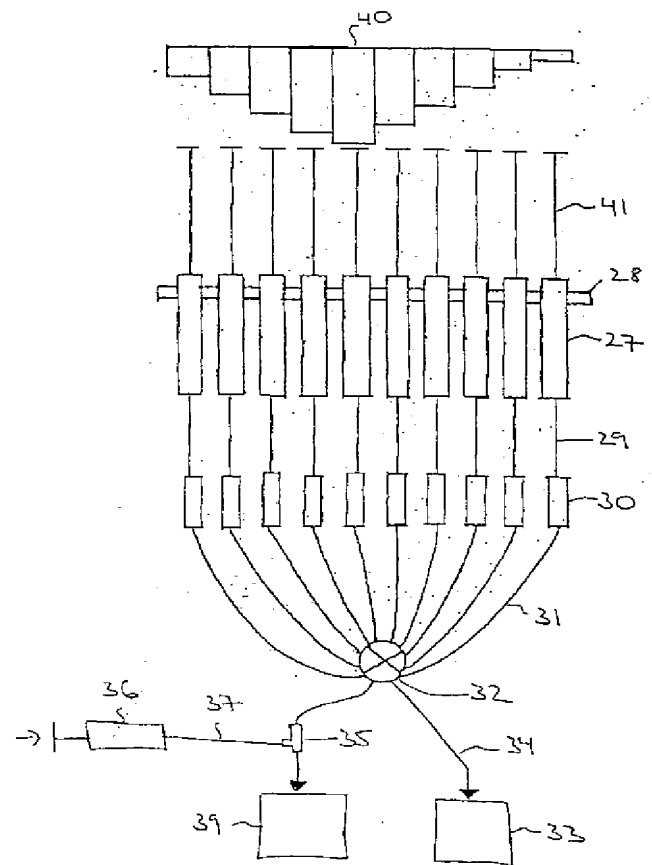
【図7B】



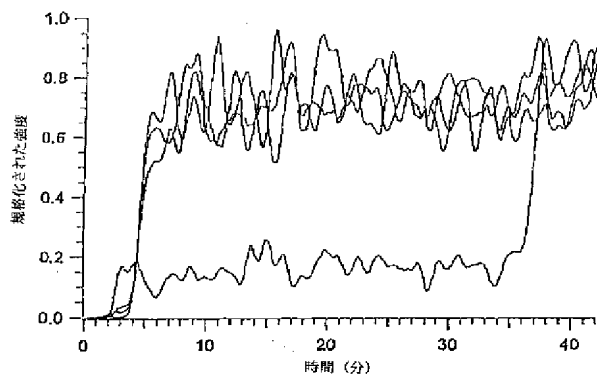
【図3】



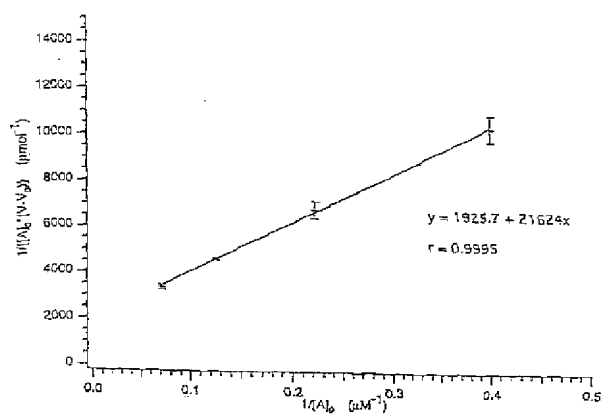
【図4】



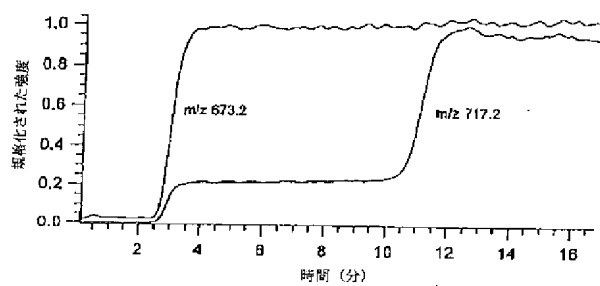
【図8】



【図6】



【図9】



フロントページの続き

(71)出願人 596121219

201, 1204 Kensington R  
oad N. W., Calgary,  
Alberta, Canada T2N  
3P5

(72)発明者 オール ハイน์ズガール

カナダ国 ティー6シー 0エックス3,  
アルバータ, エドモントン, 81 ア  
ベニュー 9330

(72)発明者 デイビッド シー, シュリーマー

カナダ国 ティー5エム 2ジー8, ア  
ルバータ, エドモントン, 109 アベニ  
ュー 13619